

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Conception, synthèse, caractérisation, évaluation pharmacologique et études in vivo de dérivés de l'harmine en tant que nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses.

Meinguet, Céline

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**UNIVERSITÉ
DE NAMUR**

FACULTÉ
DES SCIENCES

Département de Chimie

Conception, synthèse, caractérisation, évaluation pharmacologique et étude *in vivo* de dérivés de l'harmine en tant que nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses

Dissertation présentée par

Céline Meinguet

en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Chimiques

Composition du jury :

Prof. Véronique Mathieu (Université Libre de Bruxelles)

Prof. Nicolas Willand (Université du Droit et de la Santé Lille 2)

Prof. Steve Lanners (Université de Namur)

Prof. Bernard Masereel (Université de Namur)

Prof. Daniel Vercauteren (Université de Namur, président)

Prof. Johan Wouters (Université de Namur, promoteur)

2015

Conception, synthèse, caractérisation, évaluation pharmacologique et étude *in vivo* de dérivés de l'harmine en tant que nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses

Par Céline Meinguet

Résumé

L'harmine est une molécule naturelle étudiée au laboratoire notamment pour son pouvoir inhibiteur de monoamine oxydase (iMAO). Plusieurs dérivés de l'harmine, substitués en positions 2, 7 et/ou 9 ont été synthétisés et étudiés afin d'augmenter le pouvoir inhibiteur de l'harmine sur l'enzyme. Cette molécule est également connue pour son pouvoir antiprolifératif et anticancéreux. Elle permet, notamment, de contrer plusieurs caractéristiques acquises par les cellules tumorales. Dans le but de développer de nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses, une stratégie en trois temps a été mise en place, dont les iMAO mono-, di- et trisubstitués étaient le point de départ.

La première partie de ce travail est consacrée au développement et à l'optimisation de nouveaux dérivés de l'harmine combinant une activité antiproliférative micromolaire à submicromolaire et une importante solubilité au pH physiologique. De plus, la recherche du mode d'action des meilleurs candidats, les dérivés trisubstitués, a montré leur implication dans l'inhibition de la synthèse protéique. L'étude pharmacologique du meilleur composé antiprolifératif, **5n**, a révélé la sélectivité pour les cellules cancéreuses comparées aux cellules saines ainsi que sa stabilité plasmatique *in vitro*. Par contre, l'étude du pouvoir anticancéreux de **5n** sur un modèle murin pseudométastatique, après administration intrapéritonéale, a souligné le manque d'effet de la molécule. L'une des hypothèses émise étant la faible perméabilité du composé, l'étude de formulation de **5n**, en complexation avec les cyclodextrines a été envisagée dans le but de réaliser une administration intraveineuse. Cette étude a montré une importante augmentation de la solubilité de **5n** en présence de cyclodextrines, tout en maintenant son activité antiproliférative submicromolaire.

Université de Namur
FACULTÉ DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur, Belgique

Design, synthesis, characterization, pharmacological evaluation and *in vivo* study of harmine derivatives as new anticancer compounds

By Céline Meinguet

Abstract

Harmine is a natural compound studied in the laboratory for its monoamine oxidase inhibition (MAOi). Several harmine derivatives, substituted on positions 2, 7 and/or 9, have been synthesized and studied in order to increase harmine inhibition. The natural compound is also known for its antiproliferative and anticancer effect obtained by countering the hallmarks of cancer acquired by a cancer cell. In order to develop new antiproliferative compounds, a three-step strategy has been adopted where MAOi were the research starting point.

The first part was dedicated to the development and the optimization of new harmine derivatives combining a micromolar to submicromolar antiproliferative activity and a high solubility at physiological pH. Moreover, the determination of the mechanism of action of the best candidates, trisubstituted compounds, has revealed a role of these compounds as protein synthesis inhibitors. A pharmacological study of the best antiproliferative compound, **5n**, has underlined the selectivity for cancer cells compared to healthy cells and the plasmatic stability *in vitro*. However, the anticancer property study on a pseudometastatic murine model, after intraperitoneal injection, has highlighted the lack of **5n** anticancer activity on this model. One of the given hypotheses being the **5n** poor permeability, a formulation study with complexation to cyclodextrines has been considered, in order to realize intravenous administration. This study has shown an important increased **5n** solubility in presence of cyclodextrines while maintaining its submicromolar antiproliferative activity.

Ph.D. thesis in Chemistry
25th September 2015
Laboratoire de Chimie Biologique Structurale (Advisor : Prof. Johan Wouters)

Au terme de cette thèse, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à son élaboration.

Avant tout, je remercie Monsieur le Professeur Johan Wouters pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire de Chimie Biologique Structurale. Grâce à sa disponibilité et à l'attention qu'il m'a accordée, j'ai pu aborder un sujet passionnant,

Je remercie de tout cœur Monsieur le Professeur Bernard Masereel pour l'attention qu'il a portée à ce travail, pour ses conseils et sa réflexion sur la stratégie menée,

Je remercie Monsieur le Professeur Robert Kiss pour sa collaboration sur ce sujet et ses conseils dans l'élaboration de ce travail. Je remercie également de tout cœur le Professeur Véronique Mathieu pour sa collaboration mais également pour les réponses à mes nombreuses questions. Merci aussi au Docteur Céline Bruyère pour sa participation aux tests in vitro ainsi qu'à Annelise de Carvalho pour les discussions intéressantes sur ce sujet de travail que nous partageons,

Je tiens à remercier les Professeurs Steve Lanners, Bernard Masereel, Véronique Mathieu, Daniel Vercauteren, Nicolas Willand et Johan Wouters qui ont accepté d'évaluer ce travail,

Je tiens à remercier le Professeur Carine Michiels qui m'a fourni les cellules saines utilisées dans ce travail. Merci aussi pour ses conseils et sa disponibilité,

Je remercie également le Professeur Gerhard Wolber pour son accueil au sein de son laboratoire et pour la formation à l'utilisation du programme LigandScout qu'il m'a prodiguée,

Je remercie Monsieur Marc Dieu pour les mesures HRMS,

Je remercie le Professeur Raphaël Frédérick pour ses conseils et son aide dans l'élaboration du modèle CoMFA,

Je remercie le Télévie qui m'a donné la chance de réaliser ce travail et qui a financé ces recherches,

Je remercie les membres du Département de Pharmacie pour leur chaleureux accueil. Plus particulièrement je remercie le Professeur Jean-Michel Dogné qui m'a permis d'utiliser ses installations et son matériel pendant ce travail. Je remercie également de tout cœur Christelle Vancraeynest pour tous ses conseils ainsi que le Docteur Julie Laloy et Lutfiye Alpan pour la réalisation des tests in vivo...Merci aussi pour toutes nos discussions non scientifiques ! Je remercie également le Docteur Lionel Pochet pour ses conseils et Philippe Devel pour les nombreuses prises de sang ... et de souris !

Je remercie aussi mes collègues du laboratoire CBS. Merci à Jean, à Jenny, à Bernadette, à Anaëlle, à Grégoire, à Quentin et à Andrea pour leur aide, leur gentillesse, mais également pour tous ces gâteaux mangés ensemble !

Je tiens également à remercier les étudiants avec qui j'ai eu la chance de travailler. Merci à Coralie, à Nicolas, à Maxime, à Julien et à Sébastien pour le sérieux de leur travail mais également pour leur bonne humeur !

Enfin, je remercie de tout cœur ma famille ainsi que Jonathan pour leur soutien et leurs encouragements.

Liste des abréviations

2HP-βCD	Cyclodextrine β substituée par des groupements 2-hydroxypropyl
3D-QSAR	Relation structure tridimensionnelle-activité quantitative
A549	Lignée cellulaire humaine de cancer du poumon non à petites cellules
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
B16F10	Lignée cellulaire murine de mélanome
Bad	Protéine de mort associée à Bcl-2
Bai-1	Inhibiteur spécifique de l'angiogenèse du cerveau
Bcl-2	Lymphome à Cellules B
Bcl-xl	<i>Bcl-2-like protein 1</i>
BHE	Barrière hématoencéphalique
Bid	<i>BH3-Interacting-domain Death agonist</i>
BJ	Lignée cellulaire humaine de fibroblastes de peau
CCM	Chromatographie sur couche mince
αCD	Cyclodextrine α
βCD	Cyclodextrine β
γCD	Cyclodextrine γ
CD	Cyclodextrine
CE	Efficacité de complexation
CDK	Kinase cycline-dépendante
cLogP	Coefficient de partition octanol/eau calculé
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
COX-2	Cyclooxygénase-2
DCM	Dichlorométhane
DMF	N,N-Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT	Dose maximale tolérée
DYRK1A	Protéine double spécificité tyrosine kinase phosphorylée et régulée
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
eiF2α	Sous-unité α du facteur d'initiation de la synthèse protéique
Erk	Protéine kinase régulatrice des signaux extracellulaires
Fas	Récepteur membranaire à domaine de mort

GI₅₀	Concentration induisant une inhibition de la croissance cellulaire de 50%
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies <i>de</i> granulocytes et de macrophages
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
Hs683	Lignée cellulaire humaine cancéreuse d'oligodendrocyte
HUVEC	Lignée cellulaire humaine de cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentration permettant de diminuer l'activité métabolique de moitié
IL-2	Interleukine 2
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IP	Voie intrapéritonéale
IV	Voie intraveineuse
Ki	Constante d'inhibition
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de masse
LD₅₀	Dose létale médiane
MAO	Monoamine oxydase
MAO-A	Isoforme A de la monoamine oxydase
MAO-B	Isoforme B de la monoamine oxydase
MCF-7	Lignée cellulaire humaine de cancer du sein
Mcl-1	<i>Induced Myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF-κB	Facteur nucléaire kappaB
nm23	Kinase nucleoside diphosphate A
OE21	Lignée cellulaire humaine de cancer de l'œsophage
OE33	Lignée cellulaire humaine de cancer de l'œsophage
PLK1	Protéine kinase polo-like 1
PPAR-γ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes γ
ppm	Partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rpm	Rotation par minute
SD	DéviatiOn standard
SKMEL-28	Lignée cellulaire humaine de mélanome

T98G	Lignée cellulaire humaine d'astrogliome
T.A.	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
TIMP	Inhibiteur de métalloprotéase matricielle
T_M	Température de fusion de l'ADN
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale α
TNFR	Récepteur au facteur de nécrose tumoral
Tsp-1	Thrombospondine-1
U373	Lignée cellulaire humaine d'astrogliome
ULB	Université Libre de Bruxelles
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Table des matières

I. INTRODUCTION	15
1. LES B-CARBOLINES	15
2. L'HARMINE, MOLÉCULE AUX PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES	16
2.1. L'harmine et le cancer	16
2.1.1. <i>L'harmine et les caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses</i>	17
a) L'harmine induit l'expression de facteur suppresseur de tumeurs	17
b) L'harmine inhibe les signaux de prolifération	18
c) L'harmine induit la mort cellulaire	18
d) L'harmine inhibe la réplication infinie	19
e) L'harmine inhibe l'angiogenèse	19
f) L'harmine inhibe l'invasion et la formation de métastases	20
g) L'harmine stimule le système immunitaire	20
h) L'harmine et l'ensemble des caractéristiques acquises par la tumeur	20
2.1.2. <i>L'harmine et la résistance multidroque</i>	22
2.1.3. <i>La toxicité de l'harmine</i>	22
2.1.4. <i>Les dérivés de l'harmine</i>	23
a) État de l'art avant le début de ce travail (<2011)	24
b) État de l'art depuis le début de ce travail (2011-2015)	27
2.2. L'harmine et ses autres effets pharmacologiques	30
2.2.1. <i>L'harmine et le système nerveux central</i>	30
2.2.2. <i>L'harmine et le diabète</i>	30
2.2.3. <i>L'harmine et les maladies inflammatoires</i>	31
2.2.4. <i>L'harmine et les maladies parasitaires</i>	31
3. L'HARMINE ET LA CONCEPTION D'INHIBITEURS DE MAO	31
3.1. La monoamine oxydase (MAO)	31
3.2. La conception de nouveaux inhibiteurs de MAO	32
II. OBJECTIF ET STRATÉGIE	35
III. VOIES DE SYNTHÈSE CHIMIQUE	37

IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION	39
PARTIE 1: DÉCOUVERTE ET OPTIMISATION DE NOUVEAUX COMPOSÉS ANTIPROLIFÉRATIFS.	39
1. DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX DÉRIVÉS ANTIPROLIFÉRATIFS	40
1.1. Elaboration de la première génération de dérivés de l'harmine	42
2. OPTIMISATION DES DÉRIVÉS ANTIPROLIFÉRATIFS	44
2.1. Elaboration de la deuxième génération de dérivés de l'harmine	44
a) Caractérisation physico-chimique et biologique	45
2.2. Elaboration d'une relation structure tridimensionnelle-activité quantitative (3D-QSAR)	46
a) Alignement des molécules	46
b) Détermination des valeurs d'énergie d'interaction	47
c) Corrélation des données structures-activités	48
d) Visualisation des cartes de contour	50
e) Conception de nouvelles molécules	51
2.3. Etude de la troisième génération de dérivés de l'harmine	52
a) Caractérisation physico-chimique et biologique	52
3. ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION	54
3.1. Approche focalisée sur les mécanismes d'action de l'harmine	54
a) Etude de l'inhibition de DYRK1A	55
b) Etude de l'intercalation dans les brins d'ADN	56
3.2. Approche comparative basée sur l'évaluation du profil antiprolifératif	58
a) Evaluation du profil antiprolifératif des composés 1o , 2p et 2t	58
b) Comparaison des profils d'inhibition de croissance cellulaire – algorithme COMPARE	59
c) Confirmation du mécanisme d'action	62
4. CONCLUSIONS	63
PARTIE 2 : EVALUATION PHARMACOLOGIQUE ET TOXICOLOGIQUE DE 5n	66
1. ÉTUDE <i>IN SILICO</i>	66
2. ÉTUDE <i>IN VITRO</i>	66
2.1. Toxicité sélective du 5n sur les cellules cancéreuses versus les cellules saines	66
2.2. Toxicité cellulaire du 5n sur cellules saines et cellules cancéreuses au cours du temps	68
2.3. Stabilité plasmatique de 5n	70
3. ÉTUDE <i>IN VIVO</i>	71
3.1. Évaluation de la dose maximale tolérée	71
3.2. Évaluation de l'effet anticancéreux <i>in vivo</i>	73

3.3. Évaluation de la pharmacocinétique du composé 5n	75
4. CONCLUSIONS	76
PARTIE 3 : ETUDE DE LA FORMULATION DU COMPOSÉ 5n	78
1. LES CYCLODEXTRINES	78
2. ETUDE DE SOLUBILITÉ	80
2.1. Criblage des cyclodextrines	80
2.2. Expérience de solubilité de phase	81
3. ETUDE DE LA STœCHIMÉTRIE DU COMPLEXE	83
4. ETUDE DE LA GÉOMÉTRIE DU COMPLEXE 5n : βCD	85
4.1. Etude par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (¹ H-RMN)	85
4.2. Etude d'optimisation de géométrie du complexe 5n : βCD	87
5. ETUDE PHARMACOLOGIQUE DU COMPLEXE	89
6. ETUDE DE LA SOLUBILITÉ DU COMPLEXE DANS L'EXCIPIENT	89
7. CONCLUSIONS	90
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	91
VI. PARTIE EXPÉRIMENTALE	103
1. CHIMIE	103
1.1. Technique de purification	103
1.2. Techniques analytiques	103
1.3. Solvants et réactifs	105
1.4. Synthèses	105
2. ÉTUDE <i>IN SILICO</i>	125
2.1. Développement du modèle CoMFA	125
2.2. Prédiction du pouvoir pénétrant de la BHE	127
2.3. Optimisation de la géométrie du complexe 5n : βCD	127
3. ÉTUDE <i>IN VITRO</i>	128
3.1. Détermination de la solubilité cinétique	128
3.2. Détermination de la solubilité thermodynamique	129
3.3. Expérience de solubilité de phase	129
3.4. Détermination de la stœchiométrie du complexe 5n : βCD (méthode de Job)	130
3.5. Evaluation de la viabilité cellulaire (test MTT)	131
3.6. Détermination de la stabilité plasmatique de 5n	132

3.7.	Évaluation du pouvoir intercalant de l'ADN	135
4.	ÉTUDE <i>IN VIVO</i>	136
4.1.	Évaluation de la dose maximale tolérée	136
4.2.	Évaluation de l'effet anticancéreux de 5n	137
4.3.	Évaluation de la pharmacocinétique du composé 5n	138
VII.	BIBLIOGRAPHIE	139
IX.	ANNEXES	151

1. LES β -CARBOLINES

Les β -carboline sont des molécules d'origine naturelle caractérisées par un tricycle commun (**Figure 1.A**). Elles ont été initialement isolées à partir de plantes telles que *Peganum Harmala* ; elles sont aussi présentes dans la nourriture, la fumée de cigarette, ou encore, elles sont synthétisées dans certains tissus humains comme le cerveau[1–4].

L'harmine fait partie de la famille des β -carboline et présente un groupement méthyle en position 1 ainsi qu'un groupement méthoxy en position 7 (**Figure 1.B**).

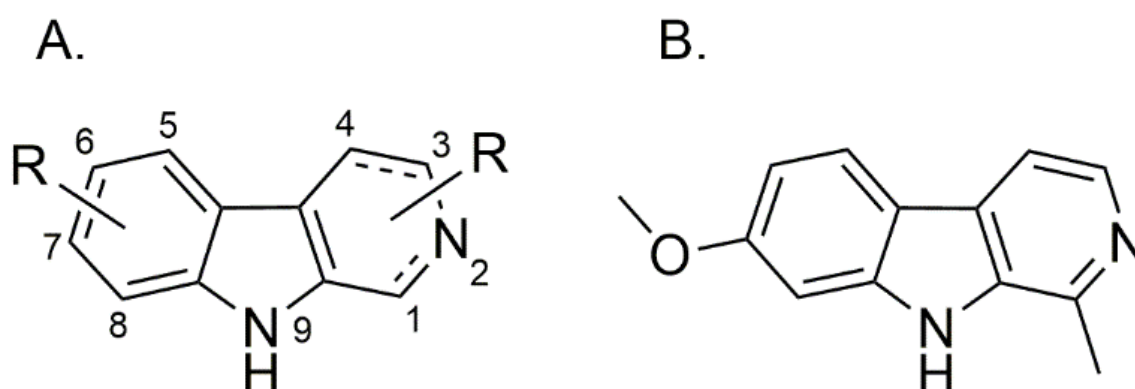


Figure 1: (A) Structure du tricycle commun des β -carboline (B) Structure de l'harmine

L'harmine était, à l'origine, utilisée par les indigènes d'Amérique du Sud. L'harmine, ainsi que la *N,N*-diméthyltryptamine sont les ingrédients principaux de l'ayahuasca, une décoction de plantes consommée, notamment, pour ses effets hallucinogènes. Ces effets sont la conséquence de la combinaison des deux molécules. En effet, la *N,N*-diméthyltryptamine est inactive après administration orale par désamination rapide opérée par la monoamine oxydase (MAO). L'inhibition de la MAO par l'harmine permet alors d'augmenter la biodisponibilité orale de la molécule hallucinogène *N,N*-diméthyltryptamine[5].

2. L'HARMINE, MOLÉCULE AUX PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

2.1. L'harmine et le cancer

L'harmine possède des propriétés antiprolifératives. En effet, des études *in vitro* ont mis en évidence la diminution de viabilité cellulaire de cellules cancéreuses provenant de divers tissus incluant le cerveau, le colon, le sein, le poumon, le foie, l'œsophage et les tissus gastriques, après un traitement par l'harmine[6–14]. Cet effet de l'harmine se confirme également *in vivo*, puisque la molécule inhibe la croissance tumorale, et ce pour divers modèles murins[6,11,13,15–17].

L'activité anticancéreuse de l'harmine est la conséquence de l'action de la molécule sur les différentes caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses (**Figure 2**)[18]. Ces caractéristiques, qui permettent la prolifération, la dissémination et la survie des cellules, regroupent :

- le maintien des signaux de prolifération,
- l'évitement aux suppresseurs de tumeurs,
- l'effet furtif vis-à-vis du système immunitaire,
- la réplication infinie de la cellule,
- l'activation de l'invasion et la capacité de formation de métastases,
- l'induction de l'angiogenèse,
- la résistance à la mort cellulaire,
- la reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule.

A ces caractéristiques, s'ajoutent deux propriétés essentielles à la cellule qui permettront sa transformation : la sensibilité de la cellule à la mutation de son génome ainsi que la transformation de la cellule par l'environnement pro-inflammatoire[18].

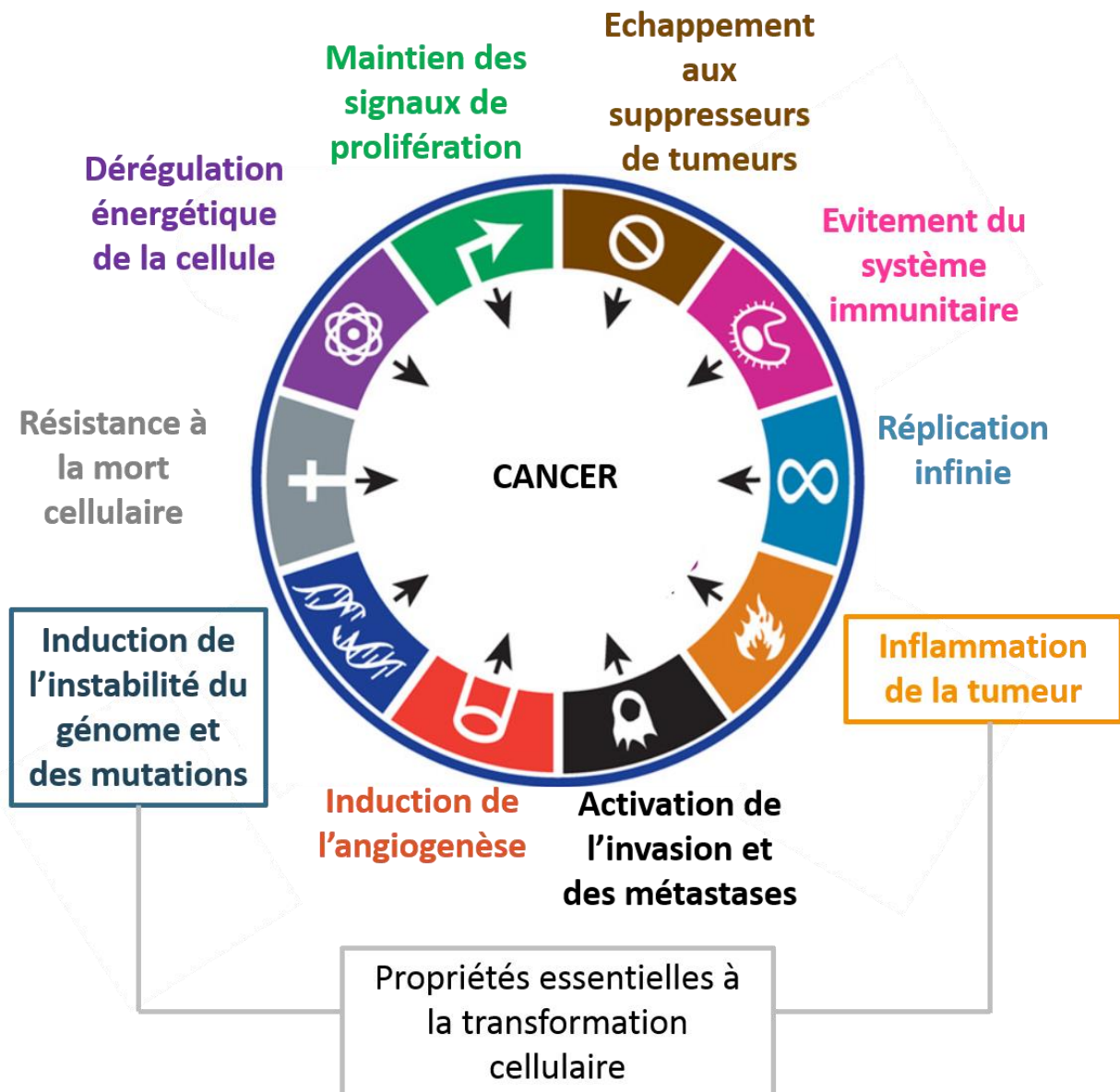


Figure 2: Propriétés essentielles à la transformation cellulaire ainsi que les caractéristiques acquises par la cellule cancéreuse (Adapté de [18]).

2.1.1. L'harmine et les caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses

a) L'harmine induit l'expression de facteur suppresseur de tumeurs

Le facteur de transcription p53 est impliqué dans l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de l'angiogenèse[19–23]. Cependant, ce suppresseur de tumeur est muté dans la plupart des cancers. L'harmine permet de **rectifier les fonctions de p53** par augmentation de son expression dans

les cellules tumorales du sein (MCF-7), de mélanome murin (B16F10) et de cellules endothéliales (HUVEC)[9,12,16].

Il est à noter qu'en fonction du type cellulaire, l'induction de l'expression de p53 par l'harmine est corrélée ou non avec des dommages créés au niveau de l'acide désoxyribonucléique (ADN)[12,16].

b) L'harmine inhibe les signaux de prolifération

L'harmine induit la **dégradation du récepteur du facteur de croissance** épidermique (EGFR) amplifié et/ou muté au sein des glioblastomes[24,25]. Ce résultat s'explique notamment par le pouvoir inhibiteur puissant de l'harmine vis-à-vis de la protéine double spécificité tyrosine kinase phosphorylée et régulée (DYRK1A)[26–28] qui prévient la dégradation de l'EGFR[29,30]. *In vivo*, l'inhibition de la croissance tumorale et un taux de survie plus important sur un modèle murin traité par l'harmine sont observés[30].

Etant donné que, d'une part, la surexpression et l'activation constitutive d'EGFR sont présentes dans un large nombre de glioblastomes agressifs et que, d'autre part, l'EGFR est associé à l'initiation et à la croissance de la tumeur[31,32], l'harmine constitue un point de départ pour la conception de nouvelles molécules anticancéreuses.

c) L'harmine induit la mort cellulaire

Un **effet pro-apoptotique** a été observé sur différentes lignées de cellules cancéreuses traitées par l'harmine[9,13–15]. Ce phénomène est la conséquence de la diminution de l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1) qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid), pour certaines de ces lignées de cellules cancéreuses, en présence d'harmine[9,11,13–15]. De plus, en présence d'harmine, et ce aussi bien *in vitro* que *in vivo*, une augmentation du récepteur de mort Fas et du ligand de facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), tous deux impliqués dans l'induction de l'apoptose, est observée[9,15,17,33].

L'harmine est également un inhibiteur de la topoisomérase 1, enzyme essentielle qui permet le déenroulement de l'ADN au cours de la réplication ou de la transcription[34,35]. Or, l'inhibition de la topoisomérase 1 a d'importantes conséquences sur le fonctionnement de la cellule puisqu'elle induit un

changement transcriptionnel, une inhibition de la réplication ainsi que des dommages à l'ADN provoquant la mort cellulaire[36–39].

Enfin, il a été montré, sur différents types cellulaires, qu'un traitement par l'harmine suivi d'une irradiation aux ultraviolets (UV) induisait la présence d'aberrations chromosomiques au sein de la cellule ainsi que la **nécrose** de celle-ci[7,40,41]. Ce résultat semble être la conséquence de dommages oxydatifs créés par l'harmine au sein de l'ADN, lors de l'intercalation de la molécule au sein de la double hélice[35,42].

d) L'harmine inhibe la réplication infinie

Il a été montré que l'harmine induisait un **arrêt du cycle cellulaire** sur différentes lignées de cellules cancéreuses. Cet effet est la cause de plusieurs mécanismes, convergeant vers l'inhibition des kinases cyclines-dépendantes (CDK), jouant un rôle crucial dans le fonctionnement du cycle cellulaire[8,12,14–16,43]. De plus, un **état de sénescence** (état viable mais non prolifératif) sur des cellules de cancer du sein (MCF-7) traitées par l'harmine a été observé[12]. Cet effet est lié à l'inhibition de l'expression de la télomérase, protéine surexprimée dans de nombreux cancers et impliquée dans l'immortalisation cellulaire[22].

e) L'harmine inhibe l'angiogenèse

L'étude de modèles murins de cancer du poumon et de mélanome a permis de mettre en évidence une diminution de la croissance de la tumeur corrélée à une diminution du nombre de capillaires formés (angiogenèse), par le traitement à l'harmine[16,33]. Cette observation a notamment été expliquée par des études *ex vivo* et *in vitro* mettant en exergue une **diminution de la néo-vascularisation, de l'invasion et de la migration de cellules endothéliales**, en présence d'harmine. Ces résultats sont la conséquence de l'effet de l'harmine sur l'expression de plusieurs facteurs pro- et anti-angiogéniques[13,16,33].

f) L'harmine inhibe l'invasion et la formation de métastases

L'invasion et la formation de métastases requièrent une motilité cellulaire permettant la migration de la cellule. Or, il a été montré que le traitement par l'harmine de cellules cancéreuses gastriques (BGC-823 et SGC-7901) ou de mélanome (B16F10) permet **d'inhiber la migration et l'invasion de ces cellules**[13,17]. De plus, une étude sur un modèle murin de mélanome induisant des métastases pulmonaires a montré que le traitement par l'harmine permettait de diminuer fortement la présence de nodules sur les poumons, et ce, pour un traitement, antérieur, simultané ou postérieur au développement de la tumeur. Ce résultat souligne l'importante **propriété anti-métastatique de l'harmine** liée à la diminution de l'expression de différents facteurs pro-métastatiques ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de facteurs anti-métastatiques, observées aussi bien *in vitro* que *in vivo*[13,17].

g) L'harmine stimule le système immunitaire

Hamsa et Kuttan ont montré sur un modèle murin de mélanome (B16F10) qu'un traitement à l'harmine permettait d'augmenter la concentration en interleukine-2 (IL-2) dans le sérum des animaux, en comparaison avec des animaux non traités[17,33]. Or, des études réalisées sur patients atteints de mélanomes ou de cancers du reins métastasés ont mis en évidence la capacité de **stimulation du système immunitaire** des patients par l'IL-2, induisant une régression de ces cancers[44]. Actuellement, l'adesleukine, une IL-2 modifiée mais d'activité biologique comparable, est utilisée dans le traitement de certains adénocarcinomes rénaux métastasés[45].

Il est à noter que la cyclooxygénase-2 (COX-2) est depuis peu décrite comme permettant à la tumeur d'échapper à la surveillance mise en place par le système immunitaire. Dès lors, le traitement par l'harmine, induisant une diminution de l'expression de cette protéine[13,33], pourrait stimuler le système immunitaire contre les cellules cancéreuses[46,47].

h) L'harmine et l'ensemble des caractéristiques acquises par la tumeur

Le **Tableau 1** résume les effets engendrés par l'harmine au sein des cellules cancéreuses, ainsi que les cibles impliquées.

Tableau 1 : Synthèse des effets de l'harmine vis-à-vis des caractéristiques adoptées par la cellule tumorale, ainsi que les cibles impliquées. Bai-1 : inhibiteur spécifique de l'angiogenèse du cerveau ; Erk : protéine kinase régulatrice des signaux extracellulaires ; iNOS : oxyde nitrique synthase inductible ; MMP : métalloprotéase matricielle ; NF- κ B : facteur nucléaire kappaB ; nm23 : kinase nucléoside diphosphate A ; TIMP : inhibiteur de métalloprotéase matricielle ; Tsp-1 : Thrombospondine-1 ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Caractéristiques adoptées par la cellule tumorale[18]	Effet de l'harmine sur les cellules cancéreuses	Cibles impliquées
Echappement aux suppresseurs de tumeurs	Augmentation de facteur suppresseur de tumeur	Augmentation de l'expression de p53[9,12]
Maintien des signaux de prolifération	Dégradation d'EGFR en surface des glioblastomes[24,25]	Inhibition de DYRK1A[26–28]
Résistance à la mort cellulaire	Induction de l'apoptose[9,13–15] et de la nécrose[7,40,41]	Induction des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid, Bad) ; inhibition des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Akt) [9,11,13–15] ; expression de TNF- α et de Fas[9,15,17,33]; inhibition de la topoisomérase 1[34,35]; intercalation de l'ADN[35,42]
Réplication infinie	Induction de l'arrêt du cycle cellulaire[14–16] et de la sénescence[12]	Inhibition des CDKs[8,12,14–16,43] ; inhibition de l'expression de la télomérase[12]
Induction de l'angiogenèse	Inhibition de l'angiogenèse[16,33]	Inhibition des facteurs pro-angiogéniques (NF- κ B, VEGF, cytokines pro-inflammatoires, iNOS, COX-2, MMP) ; induction des facteurs anti-angiogéniques (p53, Tsp-1, Bai-1, TIMP)[13,16,33]

Caractéristiques adoptées par la cellule tumorale (suite)[18]	Effet de l'harmine sur les cellules cancéreuses	Cibles impliquées
Activation de l'invasion et des métastases	Inhibition de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases[13,17]	Inhibition des facteurs pro-métastatiques (COX-2, MMP, VEGF, cytokines pro-inflammatoires, Erk) ; induction des facteurs anti-métastatiques (TIMP-1, TIMP-2, nm23) [13,17]
Évitement du système immunitaire	Stimulation du système immunitaire	Induction de l'IL-2[17,33] ; inhibition de la COX-2[13,33]

2.1.2. L'harmine et la résistance multidrogue

La recherche de nouveaux composés aux propriétés anticancéreuses se base sur les différentes caractéristiques adoptées par la cellule, permettant ainsi sa transformation. En plus de ces caractéristiques acquises, la cellule tumorale peut mettre en place des mécanismes lui permettant de devenir résistante à l'action d'agents chimiothérapeutiques. Cette résistance, appelée résistance multidrogue, est corrélée notamment à la présence de deux pompes à efflux, la glycoprotéine membranaire de perméabilité (Pgp) et la protéine de résistance du cancer du sein (BCRP). Ces protéines, présentes à la surface de la cellule cancéreuse, vont rejeter le composé thérapeutique du cytosol vers l'espace extracellulaire[48].

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité de l'harmine à contrer la résistance induite par ces deux pompes à efflux. L'inhibition de celles-ci par l'harmine permet d'augmenter la sensibilité de la cellule cancéreuse à différentes molécules telles que le mithoxantrone, la camptothécine ou la doxorubicine[49–51].

2.1.3. La toxicité de l'harmine

Bien que l'harmine possède plusieurs effets pharmacologiques, il est à noter que cette molécule présente un caractère neurotoxique *in vivo*. En effet, il a été montré que son injection s'accompagne de tétanie,

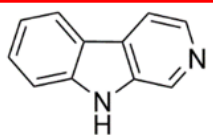
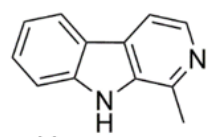
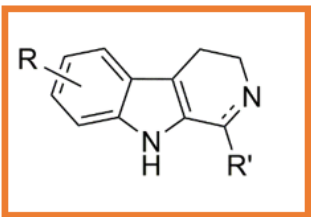
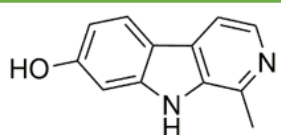
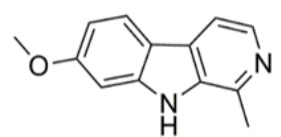
de mouvements de convulsion ou encore de tremblements, ces effets s'estompant plusieurs minutes après injection[15,52,53]. Il est également important de noter que l'harmine n'induirait, par contre, pas de génotoxicité *in vivo*[54,55].

L'existence de ces effets neurotoxiques souligne l'intérêt porté au développement de nouveaux dérivés de l'harmine exempts d'effets indésirables.

2.1.4. Les dérivés de l'harmine

La structure de l'harmine représente un point de départ intéressant dans le développement de nouvelles molécules antiprolifératives dérivées du squelette β -carboline. En effet, la molécule norharmane ainsi que sa version méthylée en position 1 (harmane) sont inactives sur diverses lignées de cellules cancéreuses (**Tableau 2**). Par contre, la substitution en position 7 par un groupement méthoxy (harmine) ou hydroxy (harmol) permet d'accroître la cytotoxicité de la molécule[6,53,56]. Il est à noter que les β -carboline naturelles présentant une insaturation au niveau du cycle pyridinique ne sont pas décrites comme des agents aux propriétés anticancéreuses.

Tableau 2 : Activité antiproliférative décrite pour les molécules naturelles possédant le squelette β -carboline.

Activité antiproliférative (μ M)		
100-1000	Non décrite	10-100
 Norharmane  Harmane		 Harmol  Harmine

Sur base de l'activité antiproliférative intéressante de l'harmine, plusieurs équipes ont étudié différents types d'analogues afin d'évaluer leur influence sur l'activité antiproliférative, en comparaison avec celle de l'harmine.

a) État de l'art avant le début de ce travail (<2011)**Influence de la complexation avec l'harmine**

Un complexe formé par l'harmine et le palladium (**Figure 3**) a montré une activité cytotoxique sur les lignées de cellules leucémiques murines (P388, L1210) et humaine (K562) ($IC_{50}=0,38\mu M$)[57]. Les résultats ont mis en évidence la cytotoxicité plus importante de ce complexe comparée à celle du carboplatine ($IC_{50}>27\mu M$), composé utilisé en tant qu'agent thérapeutique dans le cadre des tumeurs de la tête et du cou, ainsi que dans les carcinomes ovariens et pulmonaires[45]. La sensibilité des cellules au complexe harmine-palladium est, par contre, du même ordre de grandeur que les agents thérapeutiques cis-platine ($IC_{50}=0,67\mu M$) et 5-fluorouracile ($IC_{50}=1,15\mu M$), sur les cellules leucémiques murines (P388, L1210).

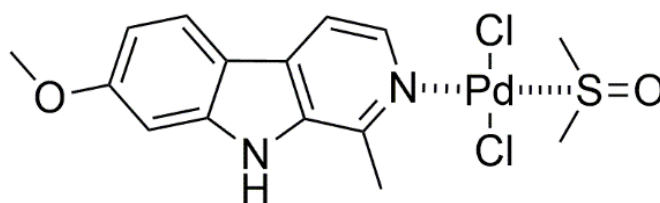


Figure 3: Structure du complexe harmine-palladium[57].

Influence de l'ajout d'un substituant sur le squelette de l'harmine

Plusieurs équipes ont étudié l'influence d'une monosubstitution de l'harmine sur l'activité antiproliférative[6,56,58]. Les résultats ont notamment mis en évidence que l'ajout d'un groupement aromatique, alkyle ou halogène, en positions 1, 2, 6, 7 ou 9 ne modifiait pas l'activité antiproliférative *in vitro* des composés par rapport à l'harmine. L'ajout d'un substituant de caractère polaire en position 9 est, par contre, défavorable à l'activité antiproliférative (**Figure 4**).

Parmi l'ensemble de ces molécules monosubstituées, une attention particulière s'est portée sur la molécule JKA97, substituée par un groupement 4-nitrobenzylidène en position 1. Des études, réalisées *in vitro*, ont montré que la molécule induisait l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire sur les cellules cancéreuses du sein (MCF7 et MDA-MB-468) et du colon (HCT116). *In vivo* il en résulte une inhibition de la croissance tumorale de ces modèles murins de xénogreffes[59,60].

Les composés substitués en position 9 par un groupement éthyle, n-butyle ou benzyle induisent une inhibition de la croissance tumorale *in vivo* supérieure (38%-45%) à celle de l'harmine (15%), sur un modèle murin de tumeur sous-cutanée (sarcome 180). Cependant, il est important de noter que malgré ce résultat intéressant, ces composés présentent les mêmes effets neurotoxiques que ceux observés après un traitement à l'harmine (tremblements, mouvements de convulsion, sauts, tétanie, supination)[6].

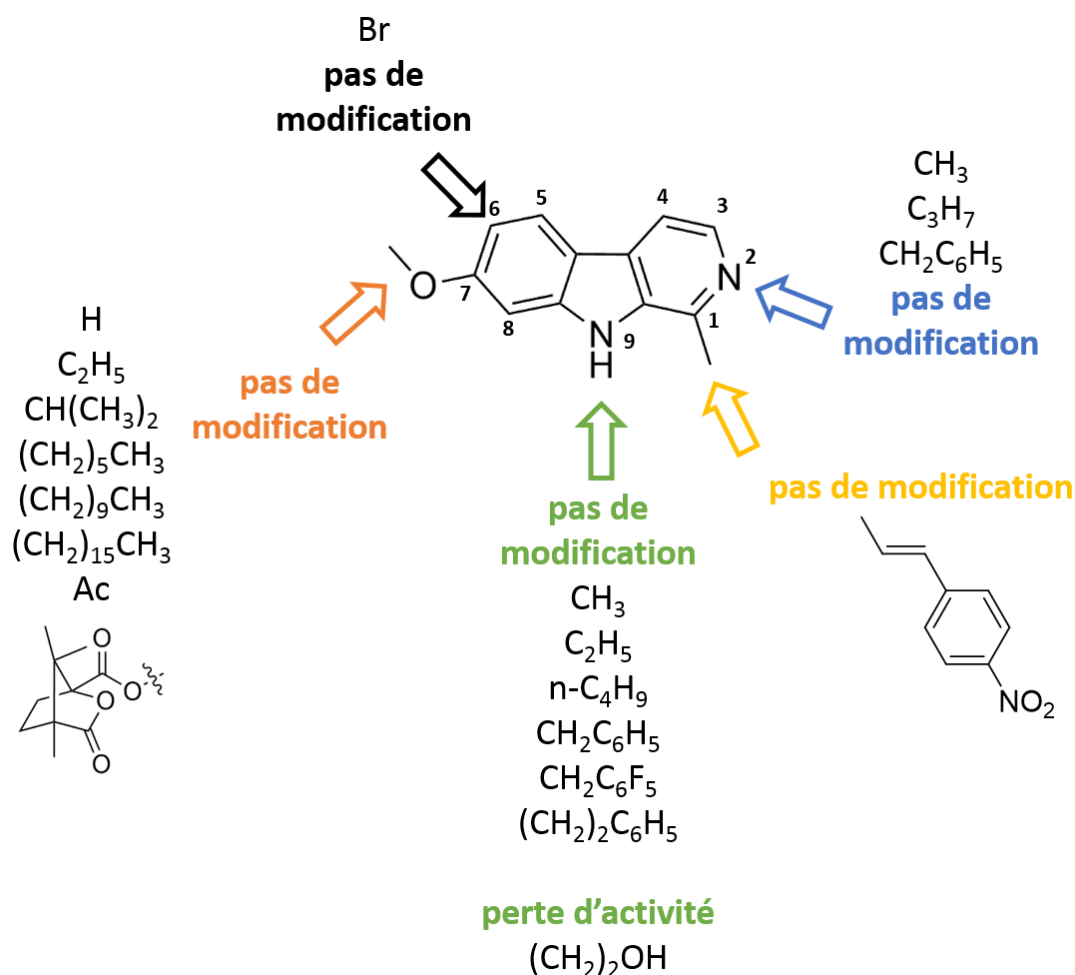


Figure 4: Représentation des différents substituants ajoutés, dans le cadre d’une monosubstitution, sur le squelette de l’harmine et effet observé par rapport à l’activité antiproliférative *in vitro* de l’harmine. L’activité antiproliférative est considérée comme étant modifiée quand elle est différente d’un ordre de grandeur par rapport à l’harmine.

Influence de l'ajout de plusieurs substituants sur le squelette de l'harmine

A partir du squelette de l'harmine, plusieurs substituants ont également été ajoutés simultanément afin d'obtenir cinq classes de composés substitués aux positions **1 et 9** ; **7 et 9** ; **2, 7 et 9** ; **1, 7 et 9** et **1, 2, 7**

et 9 (Figure 5). Ces différents composés présentent une activité antiproliférative *in vitro* sur diverses lignées de cellules cancéreuses humaines[58,61,62]. Cependant, il est intéressant de noter que les composés substitués en position R₂ présentent la meilleure activité biologique. En effet, l'ajout du substituant benzyle en cette position permet d'augmenter d'au moins un facteur dix l'activité antiproliférative des composés, en comparaison avec l'activité antiproliférative de leurs homologues non substitués en position 2 (2, 7 et 9 vs 7 et 9 et 1, 2, 7 et 9 vs 1, 7 et 9)[58,62]. L'ajout de substituants simultanément en positions 7 et 9 ne modifie par contre pas l'activité antiproliférative des composés, en comparaison avec l'activité antiproliférative de l'harmine. Il est intéressant de noter que l'activité antiproliférative de ces différents composés est du même ordre de grandeur, indépendamment du type cellulaire étudié.

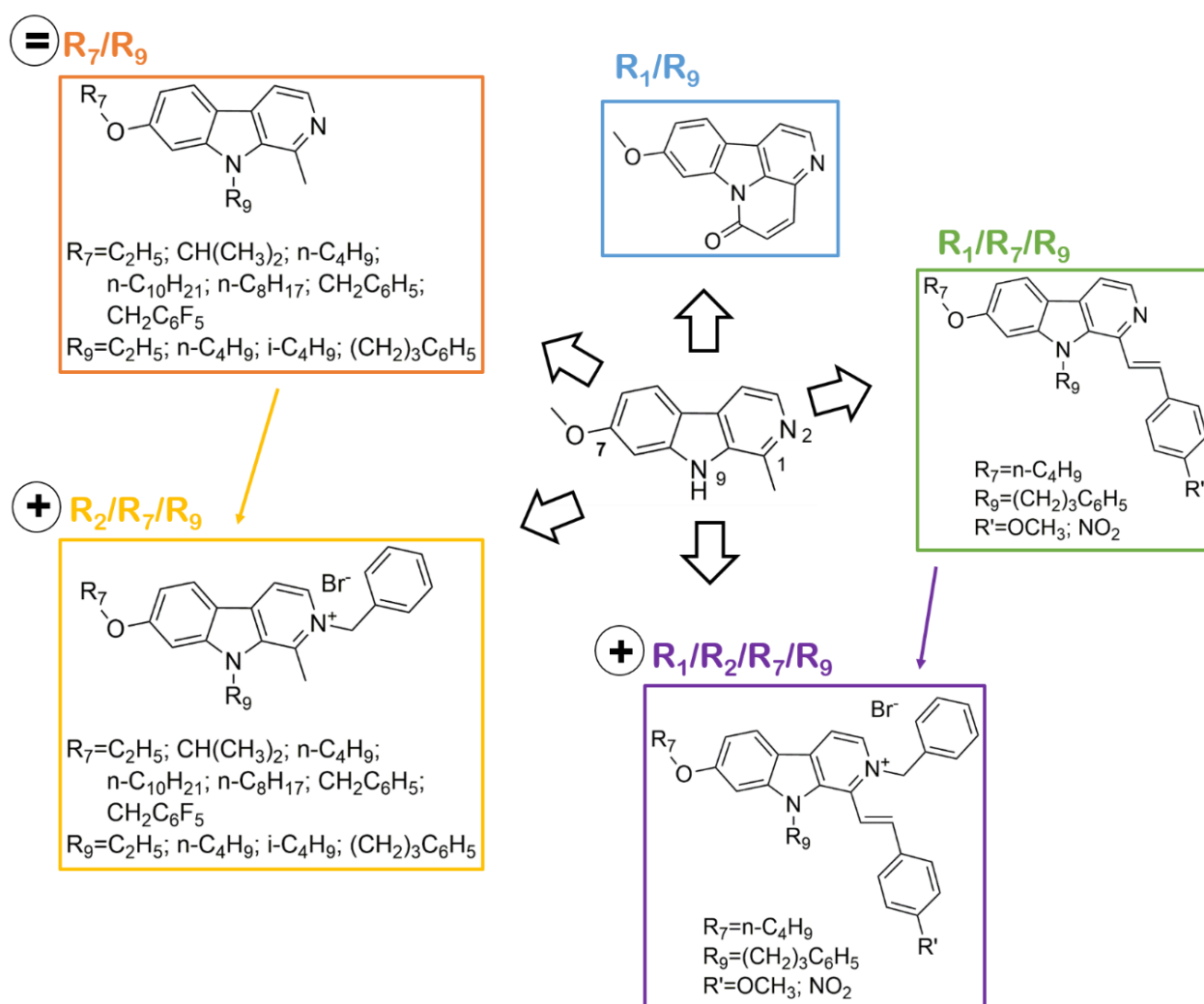


Figure 5: Représentation des différentes classes de molécules dérivées de l'harmine possédant une activité antiproliférative[58,61,62]. L'activité antiproliférative est considérée comme étant modifiée quand elle est différente d'un ordre de grandeur par rapport à l'harmine. Le sigle « = » correspond à une activité du même ordre de grandeur que l'harmine. Le sigle « + » indique une augmentation de l'activité antiproliférative d'au moins un facteur dix, par rapport à l'harmine.

b) État de l'art depuis le début de ce travail (2011-2015)**Influence de l'ajout de plusieurs substituants sur le squelette de l'harmine**Étude *in vitro*

Une étude réalisée sur les dérivés trisubstitués en positions **2, 7 et 9** a permis de confirmer l'importante activité antiproliférative de ces composés, en comparaison avec l'activité antiproliférative de l'harmine, sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses[63–66].

L'addition de substituants isoxazolines en position 9 ne permet par contre pas d'accroître l'activité antiproliférative, en comparaison avec celle de l'harmine[67].

En 2012, Si et ses collaborateurs[65] ont également mis en évidence que certains dérivés trisubstitués en positions **2, 7 et 9** (**Figure 6**) induisent un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de diverses lignées de cellules cancéreuses. Cet effet serait la conséquence d'une inhibition de la protéine kinase polo-like 1 (PLK1), impliquée dans la progression du cycle cellulaire.

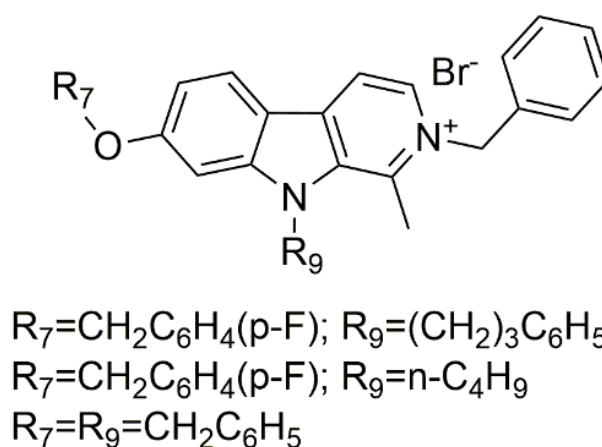


Figure 6: Structure des analogues de l'harmine étudiés en tant qu'inhibiteurs de PLK1.

Étude *in vivo*

L'étude *in vivo* des composés substitués en positions **7 et 9** et en positions **2, 7 et 9** a mis en évidence l'influence de la substitution sur la toxicité des composés (**Tableau 3**). La détermination de la dose induisant la mort de 50% de la population étudiée (LD_{50}) a montré que les dérivés disubstitués en positions **7 et 9** sont moins toxiques ($\text{LD}_{50} \geq 100 \text{ mg.kg}^{-1}$) que l'harmine ($\text{LD}_{50} = 59 \text{ mg.kg}^{-1}$). Par contre,

les dérivés trisubstitués en positions **2, 7 et 9** étudiés sont plus toxiques ($LD_{50}<13\text{ mg.kg}^{-1}$) que l’harmine.

Tableau 3 : Résultats obtenus après étude *in vivo* des analogues substitués en positions **7 et 9** et en positions **2, 7 et 9**, comparés aux résultats obtenus avec l’harmine[63,64].

Composés	Substituants			Toxicité (LD_{50}^a ; mg.kg^{-1})	Dose (mg.kg^{-1})	Inhibition de la croissance tumorale ^b		Effet neuro- toxique ^e
	R2	R7	R9			Sarcome ^c	Cancer du poumon ^d	
Harmine	/	CH ₃	/	59	7,5	/	/	+
Analogues 7 et 9	/	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅ , CH(CH ₂ CH ₃) ₂	C ₂ H ₅ , (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	≥100	≥20	=	=	-
Analogues 2, 7 et 9	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH(CH ₃) ₂ , (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅ , CH ₂ C ₆ F ₅ , CH ₂ C ₆ H ₅ , CH(CH ₂ CH ₃) ₂	C ₂ H ₅ , (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅ , CH ₂ CH(CH ₃) ₂	<13	<2,5	+	=	-

^a LD_{50} : dose induisant la mort de 50% de la population étudiée. ^bInhibition de la croissance tumorale, comparée à celle observée pour l’harmine, « = » correspond à une inhibition du même ordre de grandeur, « + » correspond à une inhibition plus importante que celle observée pour l’harmine. ^cModèle murin de tumeur sous-cutanée obtenu après administration de cellules de sarcome (sarcome 180). ^dModèle murin de tumeur sous-cutanée obtenu après administration de cellules du cancer de poumon de Lewis. ^eTremblements, mouvements de convulsion, sauts, tétanie, supination. « + » correspond à la présence de ces effets, « - » correspond à l’absence de ces effets.

L'évaluation du pouvoir anticancéreux de ces dérivés (**Tableau 3**) a montré que les dérivés trisubstitués en positions **2, 7 et 9** présentaient une inhibition de la croissance tumorale plus importante (inhibition moyenne de 46%) que l'harmine (inhibition moyenne de 31%) sur le modèle de sarcome 180[63,64,66], et ce pour une dose plus faible ($<2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) en composé par rapport à la dose utilisée dans le cas de l'harmine ($7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$). Les analogues étudiés présentent, par contre, une inhibition de la croissance tumorale similaire (inhibition moyenne de 28%) à celle de l'harmine (inhibition moyenne de 34%) sur le modèle de cancer du poumon. Il est également intéressant de noter que les composés disubstitués en positions **7 et 9** étudiés et les composés trisubstitués en positions **2, 7 et 9** entraînent une perte des effets neurotoxiques observés habituellement avec l'harmine[63,64,66].

Etude d'analogues bivalents de l'harmine

Les analogues bivalents (**Figure 7**) de l'harmine possèdent également une activité antiproliférative sur diverses lignées de cellules cancéreuses. Cependant, ces dérivés présentent une sensibilité différente en fonction de la lignée cellulaire étudiée, contrairement aux dérivés disubstitués et trisubstitués décrits ci-dessus[68]; ceci pourrait signifier la présence d'un mécanisme d'action différent.

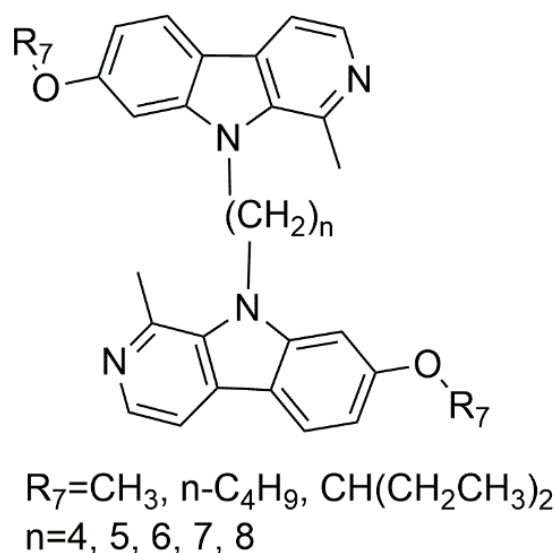


Figure 7: Structure des analogues bivalents de l'harmine

2.2. L'harmine et ses autres effets pharmacologiques

En plus de ses propriétés anticancéreuses, l'harmine possède également d'autres propriétés pharmacologiques dont certaines sont décrites ci-dessous.

2.2.1. L'harmine et le système nerveux central

En plus de jouer un rôle antidépresseur par inhibition de l'isoforme A de la MAO (MAO-A)[69–71], rôle sur lequel nous reviendrons, l'harmine inhibe l'autophosphorylation de DYRK1A menant ainsi à l'inactivation de la protéine[26,27]. Cette protéine est impliquée dans le développement neuronal et est surexprimée dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que le syndrome de Down, la maladie de Pick et la maladie d'Alzheimer[72]. Dès lors, l'harmine représente un point de départ pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Il a également été montré que l'harmine pouvait se lier aux récepteurs aux imidazoles I₁ et I₂, ainsi qu'aux récepteurs à la sérotonine 5HT_{2A} et 5HT_{2C}[73–75].

2.2.2. L'harmine et le diabète

Un effet antidiabétique *in vivo* de l'harmine a également été observé. Il résulte de l'augmentation de l'expression du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes γ (PPAR- γ), facteur nucléaire qui permet d'augmenter la sensibilité des adipocytes à l'insuline. Cet effet serait notamment expliqué par une diminution des cytokines pro-inflammatoires *in vivo* TNF- α et interleukine-1 β ainsi que de l'iNOS qui entrainerait ainsi une diminution de l'inflammation des tissus adipeux, responsable de l'insulino-résistance[76].

2.2.3. L'harmine et les maladies inflammatoires

L'harmine permet également une diminution de la production en cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , le monoxyde d'azote et l'interleukine-6. Cette interleukine étant produite dans des maladies chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde, l'harmine est un point de départ intéressant dans la recherche de nouvelles molécules aux propriétés anti-inflammatoires[77].

Récemment, des chercheurs ont montré un effet de l'harmine sur les chondrocytes, cellules du cartilage. Plus précisément, l'incubation des cellules en présence d'harmine induit l'expression de protéines permettant une résistance à la dégradation du cartilage et serait ainsi bénéfique dans le traitement de l'arthrose. Cet effet est notamment lié à une diminution de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α [78].

2.2.4. L'harmine et les maladies parasitaires

L'harmine a été identifiée en tant qu'agent anti-malarique. En effet, la molécule se lie au domaine de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) de la protéine de choc thermique 90 (Hsp90) provenant du pathogène *Plasmodium Falcifarum*[79]. Des études ont également mis en évidence l'effet synergique sur le modèle murin de *Plasmodium berghei* obtenu par combinaison de l'harmine et de l'anti-malarien chloroquine[80]. D'autres effets antiparasitaires et insecticides de l'harmine ont également été observés[81–83].

3. L'HARMINE ET LA CONCEPTION D'INHIBITEURS DE MAO

3.1. La monoamine oxydase (MAO)

La MAO est une flavoenzyme ancrée dans la membrane externe des mitochondries de plusieurs lignées cellulaires, incluant les cellules neuronales. Cette enzyme catalyse la désamination de neurotransmetteurs tels que la sérotonine et la dopamine[84]. Deux isoformes de l'enzyme ont été découvertes, la MAO-A et la MAO-B, distribuées notamment de manières différentes au sein du cerveau. La MAO-A est principalement présente au sein des neurones catécholaminergiques, alors que

la MAO-B est surexprimée au sein des neurones sérotoninergiques et histaminergiques[85,86]. Les inhibiteurs de MAO-A sont utilisés dans le traitement de plusieurs maladies incluant la dépression tandis que les inhibiteurs de MAO-B sont indiqués dans le cas des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson[87–89].

3.2. La conception de nouveaux inhibiteurs de MAO

Bien que les MAOs soient des cibles thérapeutiques pour une large gamme de pathologies, les inhibiteurs de ces enzymes possèdent des effets indésirables liés notamment à un manque de sélectivité des composés. Dès lors, un projet ayant pour but la découverte de nouvelles molécules inhibitrices et sélectives des MAO-A a été abordé au sein du laboratoire de Chimie Biologique Structurale de l'Université de Namur[90,91]. La structure cristallographique du complexe harmine-MAO-A (**Figure 8**) fut le point de départ de la conception de ces nouvelles molécules[92].

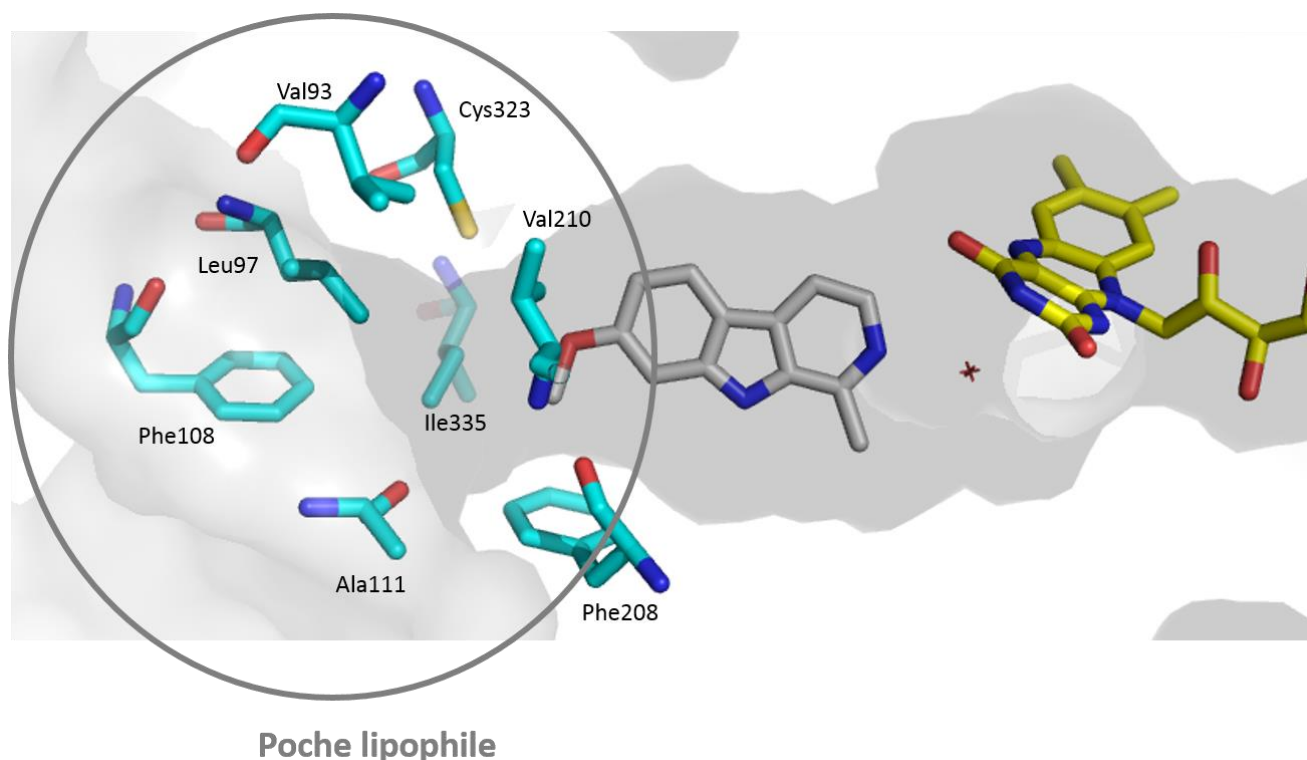


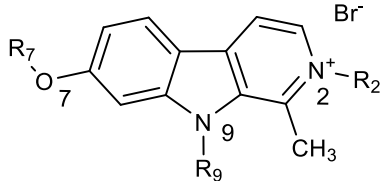
Figure 8: Visualisation du site de liaison de l'harmine (gris) au sein de la MAO-A (PDB : 2Z5X)[92]. Les acides aminés inclus dans le site actif sont présentés en turquoise. Le cofacteur flavine adénine dinucléotide est présenté en jaune.

A partir de la structure cristallographique du complexe présenté en **Figure 8**, il a été observé qu'une poche lipophile formée des résidus Val93, Leu97, Phe108, Ala111, Phe208, Val210, Cys323 et Ile335 était restée vacante au niveau du groupement méthoxy présent en position 7 du squelette β -carboline.

Dans le but d'obtenir des molécules possédant un pouvoir inhibiteur de MAO-A plus important que l'harmine ($K_I=16,9$ nM), seize nouvelles molécules ont été synthétisées afin d'étudier l'influence de substituant en position 7 sur l'inhibition de l'enzyme (**1a-l**)(**Tableau 4**)[90,91]. Cette étude a permis de révéler que l'addition d'une chaîne aliphatique (**1a**, **1b**, **1e**), d'un groupement cyclohexyle (**1f**) et d'un groupement phényle (**1k**), en position 7, permettait d'augmenter le pouvoir inhibiteur de MAO-A d'un facteur dix, comparé à l'harmine. De plus, ces nouvelles molécules possèdent un meilleur pouvoir inhibiteur de MAO-A comparé à MAO-B.

Cette étude a également permis de mettre en évidence que les substitutions en positions 2 et 9 induisaient une perte de l'activité inhibitrice par rapport à l'harmine (**1m-o**). De manière générale, lorsque le nombre de substituants augmente (R_2 , R_7 et R_9), le pouvoir inhibiteur de MAO-A diminue fortement (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Pouvoir inhibiteur de l'harmine et de ses dérivés sur les enzymes MAO-A et MAO-B[90,91].

Composé				K _i hMAO-A (nM) ^a	K _i hMAO-B (nM) ^a
	R ₇	R ₉	R ₂		
harmine	CH ₃	H	-	16,9 (13,7-21,0)	120800 (94900-153900)
1a	CH ₂ CH=CH ₂	H	-	5,0 (4,5-5,6)	NI ^b
1b	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	-	3,9 (2,0-7,7)	>500
1c	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	-	29,5 (24,0-36,3)	NI
1d	CH ₂ CH ₂ OH	H	-	28,4 (20,0-40,3)	NI
1e	(CH ₂) ₃ CF ₃	H	-	3,6 (2,6-5,0)	>500
1f	CH ₂ C ₆ H ₁₁	H	-	4,3 (3,2-5,6)	221,6 (145,1-338,3)
1g	CH ₂ -2'-pyridyl	H	-	≈500	NI
1h	CH ₂ -3'-pyridyl	H	-	24,9 (20,1-30,7)	NI
1i	CH ₂ -4'-pyridyl	H	-	35,4 (18,9-66,5)	NI
1j	CH ₂ -2'-naphtyl	H	-	100<K _i <500	NI
1k	CH ₂ C ₆ H ₅	H	-	12,6 (11,6-13,7)	>500
1l	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	H	-	5,0 (4,0-6,2)	>500
1m	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	-	NI	>500
1n	CH ₂ C ₆ H ₅	H	CH ₂ C ₆ H ₅	≈500	>500
1o	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	NI	>500

^a Les résultats sont présentés sous forme de moyenne, avec l'intervalle de confiance à 95% entre parenthèses (n=3). ^b NI : Pas d'inhibition à 1μM

Le cancer reste une maladie qui induit l'un des plus hauts taux de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2012, quatorze millions de nouveaux cas étaient dénombrés et cela devrait augmenter de 70% dans les vingt prochaines années[93]. Pour ces raisons, la recherche de nouvelles molécules à visée anticancéreuse reste primordiale.

Sur base de ces informations, **l'objectif de ce travail de thèse, financé par le Télévie, est de concevoir de nouvelles molécules possédant des propriétés anticancéreuses.**

Pour ce faire, et sur base de l'activité anticancéreuse importante observée pour l'harmine, les dérivés synthétisés initialement comme inhibiteurs de MAO seront le point de départ de cette recherche. Celle-ci sera divisée en trois parties (**Figure 9**).

La première partie de ce travail, qui est également la plus conséquente, se consacrera au développement et à l'optimisation de nouveaux composés possédant des propriétés antiprolifératives *in vitro*. Dès lors, l'activité antiproliférative des composés sera évaluée sur différentes lignées de cellules cancéreuses. De plus, la solubilité au pH physiologique sera également déterminée. En effet, ce paramètre est important puisqu'une trop faible solubilité est limitante pour le développement de futurs médicaments. L'activité antiproliférative et la solubilité seront utilisées comme des filtres afin de définir si le composé est un bon chef de file. Dans le cas où le composé ne présente pas de bonnes propriétés, la conception et la synthèse de nouvelles molécules seront envisagées. Ces molécules seront à nouveau caractérisées et ce processus itératif ne s'arrêtera qu'en présence d'un bon candidat. Celui-ci fera alors l'objet d'une étude plus approfondie.

Lors du développement de ces composés, une attention particulière sera également accordée à l'étude du mécanisme d'action des molécules possédant la meilleure activité antiproliférative *in vitro*. En effet, la connaissance de(s) cible(s) de ces composés permettra d'améliorer la conception de nouveaux composés.

Le profil de toxicité et la pharmacodynamie du meilleur candidat seront évalués. Des études *in silico*, *in vitro* et *in vivo* permettront de définir la toxicité ainsi que l'efficacité de ce composé. Suite à ces résultats, l'étude de la formulation du meilleur candidat pourra être réalisée afin d'en améliorer la biodisponibilité. La nouvelle formulation proposée pourra ensuite être évaluée.

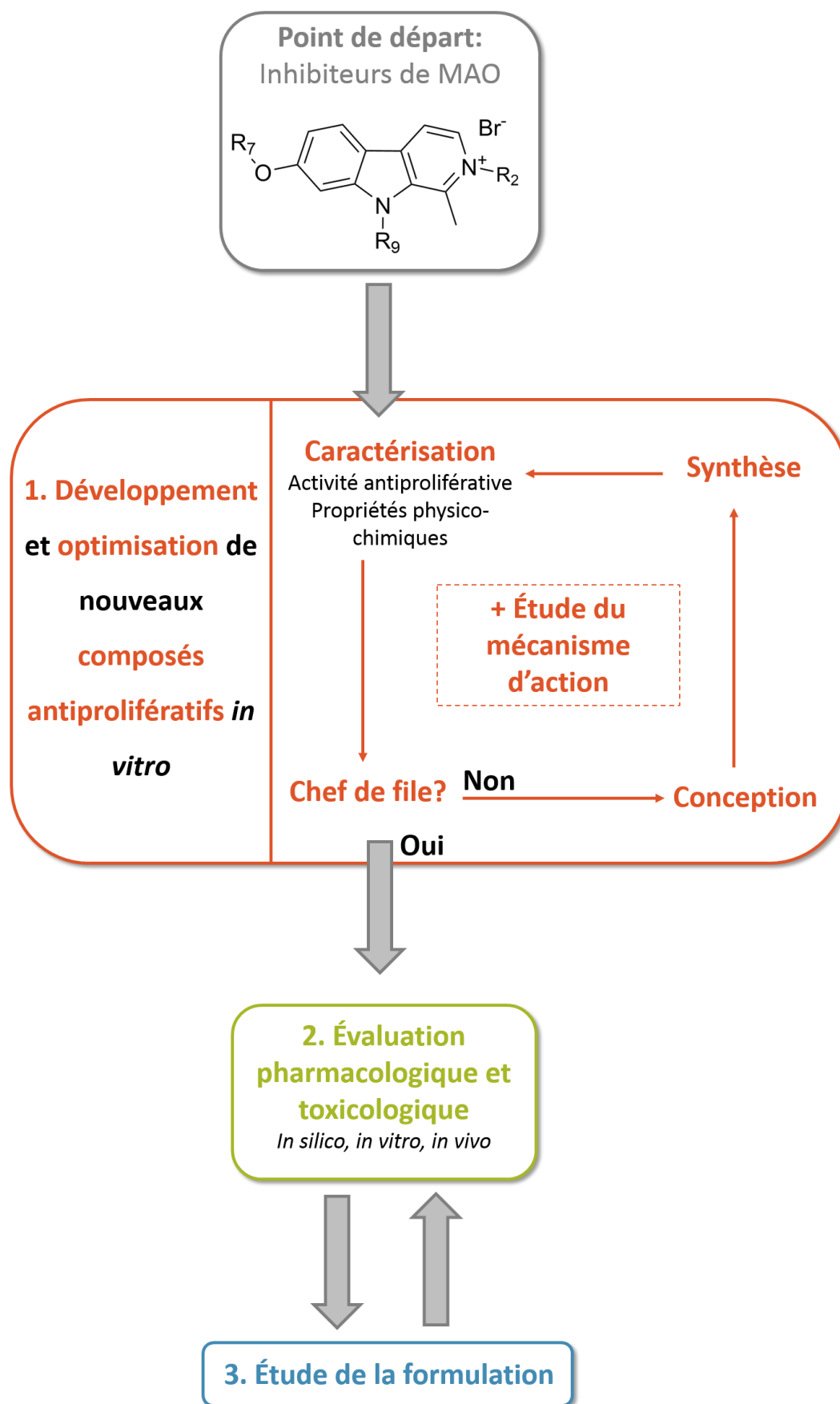
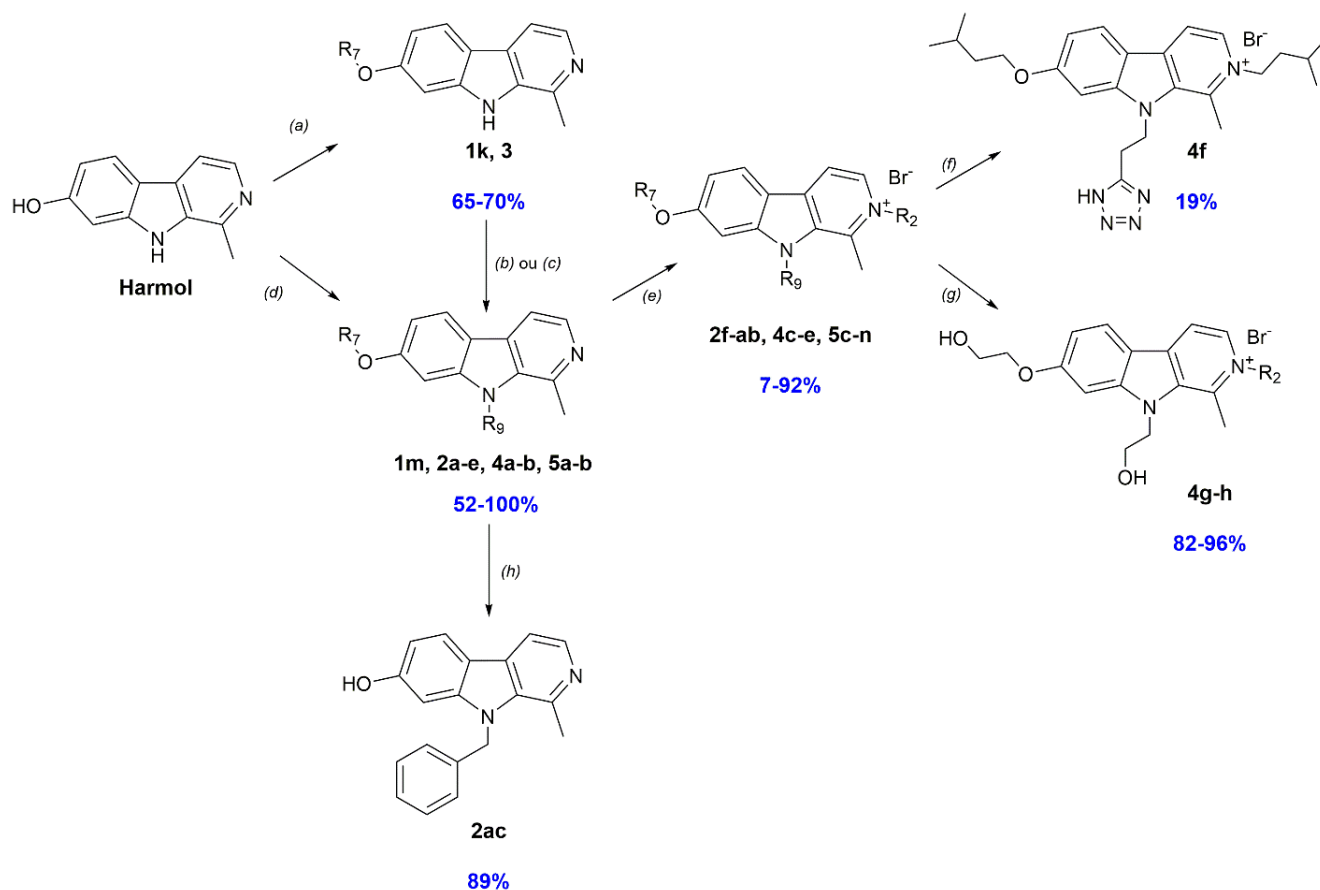


Figure 9: Représentation schématique de la stratégie adoptée afin d'identifier de nouvelles molécules possédant des propriétés anticancéreuses.

Les dérivés de l'harmine mentionnés dans ce travail (**2a-ac**, **3**, **4a-h** et **5a-n**) ont été synthétisés suivant la stratégie présentée à la **Figure 10**. La structure de ces composés est présentée à l'**Annexe A**. La synthèse des composés **1a-o** est décrite dans la littérature[90,91].



(a) R_7Br (1,5 équiv), Cs_2CO_3 (3 équiv), DMF, T.A. 24h ; (b) 1-iodopropane (1,5 équiv), NaH (5 équiv), DMF, Ar, T.A., 24h ; (c) acrylonitrile (7 équiv), Triton B, T.A. 5min ; (d) $R_7(=R_9)Br$ (2 équiv), KOH (5 équiv), DMF, Ar, T.A., 24h ; (e) R_2Br (10 équiv), THF, irradiation micro-ondes, 140°C, 3h ou R_2Br (10 équiv), THF, Ar, reflux, 48h ; (f) NaN_3 (4.5 équiv), NH_4Cl (4 équiv), DMF, reflux, 12h ; (g) H_2 , Pd/C 10%, EtOH, T.A., 48h ; (h) H_2 , Pd/C 10%, MeOH, T.A., 48h.

Figure 10: Schéma de synthèse des analogues de l'harmine. La gamme de rendement obtenu pour chaque réaction et non optimisé est inscrite en bleu.

A partir d'harmol, correspondant à l'harmine déméthylée en position 7, deux voies ont été abordées afin d'obtenir les dérivés 7,9-disubstitués (**2a-e**, **4a-b** et **5a-b**).

La première voie consiste en une disubstitution en deux étapes et est utilisée lorsque les substituants R₇ et R₉ sont différents. Une première alkylation en position 7 est réalisée à partir d'harmol et de bromure d'alkyle adéquat en présence de carbonate de césium, dans le N,N-diméthylformamide (DMF) (a)[43,91]. Ensuite, le composé O₇-substitué (**1k**, **3**) obtenu est dissout dans le DMF et est mis en réaction avec du 1-iodopropane et de l'hydruire de sodium, sous atmosphère inerte, afin de donner le composé 1-méthyl-O₇-substitué-N₉-substitué-β-carboline (**2e**, **5a**) (b)[58]. Une stratégie différente est utilisée afin d'obtenir le composé **4a**. Dans ce cas, le composé **3** réagit avec de l'acrylonitrile et du Triton B afin d'ajouter le substituant N₉-propionitrile (c)[94].

La seconde voie est utilisée quand les substituants R₇ et R₉ sont identiques. Les composés **2a-d**, **4b** et **5b** ont été synthétisés par alkylation simultanée de l'harmol en positions 7 et 9, en utilisant le bromure d'alkyle adéquat ainsi que de l'hydroxyde de potassium dans le DMF (d)[90].

Les composés 2,7,9-trisubstitués **2f-ab**, **4c-e** et **5c-n** ont été obtenus par une alkylation en position 2 de l'intermédiaire 7,9-disubstitué, en présence de bromure d'alkyle adéquat dans le tétrahydrofurane (THF) (e)[90].

Le dérivé nitrile **4e** a été converti en dérivé tétrazole correspondant **4f** en utilisant de l'azoture de sodium et du chlorure d'ammonium dans le DMF (f)[94,95].

Les substituants éthers de benzyle présents au niveau des molécules **4c** et **4d** ont été réduits par une hydrogénation catalysée par le palladium, permettant d'obtenir respectivement les composés **4g** et **4h** (g)[96].

Enfin, l'hydrogénation catalysée par le palladium du composé **1m**[91] a permis d'obtenir le composé **2ac(h)**.

Chaque composé synthétisé a été analysé par ¹H-RMN, ¹³C-RMN, spectrométrie de masse et point de fusion. La pureté des composés caractérisés biologiquement et physico-chimiquement (**2a-ac**, **4f-h**, **5c-n**) a été déterminée comme supérieure à 95% par LC-MS. La pureté des composés finaux a été évaluée soit par analyse élémentaire (différence maximale de 0,4% par rapport aux pourcentages théoriques, pour chacun des atomes), par spectrométrie de masse haute résolution ou par la combinaison de deux méthodes de chromatographie liquide couplée ou non à un spectromètre de masse. Les méthodes utilisées et les résultats de ces analyses sont décrits au sein de la Partie Expérimentale.

Partie 1:

Découverte et optimisation de nouveaux composés antiprolifératifs.

Cette première partie du travail est consacrée, dans un premier temps, à la découverte de nouvelles molécules aux propriétés biologiques et physico-chimiques intéressantes, ainsi qu'à l'optimisation de ces propriétés.

A partir de données présentes au laboratoire et suivant les résultats décrits dans la littérature, le pouvoir antiprolifératif de divers dérivés de l'harmine sera évalué. Cette recherche de nouvelles molécules à visée antiproliférative sera réalisée en portant une attention particulière à la solubilité des composés. Ce paramètre est important dans l'élaboration de nouvelles molécules. En effet, une faible solubilité est défavorable au développement d'un composé, notamment en limitant son absorption ou encore en restreignant les doses pouvant être administrées par voie intraveineuse (IV). Dès lors, la solubilité sera utilisée comme un filtre à la conception de nouvelles molécules. Plus précisément, une solubilité thermodynamique supérieure à $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ [97] et une activité antiproliférative supérieure à l'activité antiproliférative de l'harmine permettront de qualifier le candidat en tant que chef de file.

Dans un second temps, le mécanisme d'action de ces nouvelles molécules sera étudié.

1. DÉCOUVERTE DE NOUVEAUX DÉRIVÉS ANTIPROLIFÉRATIFS

Ayant pour but de découvrir de nouvelles molécules aux propriétés anticancéreuses, et connaissant l'activité antitumorale décrite pour l'harmine, l'activité antiproliférative des 15 dérivés de l'harmine synthétisés en tant qu'inhibiteurs de MAO-A[91] dans le cadre du développement de nouveaux antidépresseurs a été envisagée. La concentration permettant de diminuer la viabilité cellulaire de moitié (IC_{50}) a été déterminée par un test de viabilité sur trois lignées de gliomes humains (U373, Hs683 et T98G) ainsi que sur deux lignées de cellules cancéreuses humaines de l'œsophage (OE21, OE33), après 72 heures d'incubation. Le choix de ces lignées cellulaires se concentrant notamment sur l'étude des gliomes se base sur le fait que ces cancers sont très agressifs avec l'un des taux de survie sur 5 ans les plus faibles (19%) entre 2010 et 2011[98].

Le test de viabilité cellulaire consiste en un test colorimétrique au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) qui mesure la conversion du MTT (couleur jaune) en formazan (couleur mauve), au moyen d'une réduction par la succinate déshydrogénase mitochondriale (**Figure 11**). La concentration de formazan formé est mesurée par spectrophotométrie et est directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives, soit les cellules vivantes.

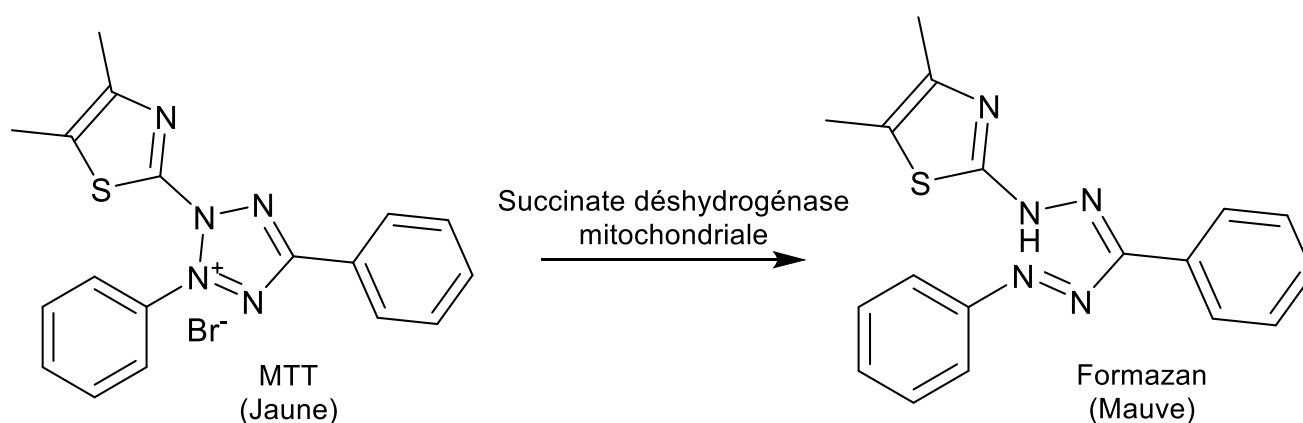
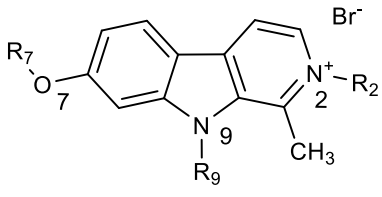


Figure 11: Conversion du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale.

L' IC_{50} moyenne obtenue pour chaque molécule est repris dans le **Tableau 5**. Les valeurs d' IC_{50} obtenues pour chaque lignée cellulaire cancéreuse sont quant à elles détaillées à l'**Annexe B**[10,90].

Tableau 5: Structures, IC₅₀ moyennes obtenues sur cinq lignées de cellules cancéreuses et valeurs d'inhibition (K_I) de l'enzyme MAO-A de l'harmine et de ses dérivés.

Composé				Activité	
	R ₇	R ₉	R ₂	antiproliférative ^a : IC ₅₀ moyenne ± SD ^b (μM)	K _I hMAO-A (nM) ^c
harmine	CH ₃	H	-	28±7	16,9 (13,7-21,0)
1a	CH ₂ CH=CH ₂	H	-	30±2	5,0 (4,5-5,6)
1b	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H	-	21±5	3,9 (2,0-7,7)
1c	CH ₂ CH ₂ OCH ₃	H	-	59±6	29,5 (24,0-36,3)
1d	CH ₂ CH ₂ OH	H	-	46±13	28,4 (20,0-40,3)
1e	(CH ₂) ₃ CF ₃	H	-	>86	3,6 (2,6-5,0)
1f	CH ₂ C ₆ H ₁₁	H	-	11±6	4,3 (3,2-5,6)
1g	CH ₂ -2'-pyridyl	H	-	20±3	≈500
1h	CH ₂ -3'-pyridyl	H	-	28±3	24,9 (20,1-30,7)
1i	CH ₂ -4'-pyridyl	H	-	5.1±2.2	35,4 (18,9-66,5)
1j	CH ₂ -2'-naphtyl	H	-	16±11	100<K _I <500
1k	CH ₂ C ₆ H ₅	H	-	14±7	12,6 (11,6-13,7)
1l	CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	H	-	15±6	5,0 (4,0-6,2)
1m	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	-	31±8	NI ^d
1n	CH ₂ C ₆ H ₅	H	CH ₂ C ₆ H ₅	4.9±1.1	≈500
1o	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ C ₆ H ₅	0.7±0.4	NI

^aLes valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées par le Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr. Véronique Mathieu). ^bSD : Déviation standard. ^cLes résultats sont présentés avec l'intervalle de confiance à 95% entre parenthèses. ^dNI : Pas d'inhibition à 1 μM

Les résultats (**Tableau 5**) montrent que les substitutions en positions 7 (**1a-l**) ; 7/9 (**1m**) et 2/7 (**1n**) n'influencent pas, ou peu l'activité antiproliférative de l'harmine. Par contre, la combinaison de trois substituants en positions 2, 7 et 9 permet d'atteindre une valeur d'IC₅₀ moyenne de 0,7±0,4μM (**1o**). Ceci correspond à une augmentation de l'activité antiproliférative de l'harmine de 40 fois et permet ainsi d'atteindre une activité antiproliférative submicromolaire.

On remarque également dans le **Tableau 5** que, pour chaque composé étudié, les valeurs de déviation standard sur l'IC₅₀ moyenne sont faibles, indiquant que les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour un composé sont du même ordre de grandeur, indépendamment de la sensibilité (Hs683) ou la résistance (U373) aux stimuli pro-apoptotiques des lignées cellulaires étudiées (**Annexe B**)[99]. Cette observation pourrait être le reflet d'un mécanisme antiprolifératif n'induisant pas l'apoptose à l'IC₅₀.

Il est également à noter que le composé **1o**, présentant l'activité antiproliférative la plus intéressante, n'est pas actif sur MAO-A (**Tableau 5**), contrairement aux molécules moins actives sur les cellules cancéreuses, mettant ainsi en lumière une certaine sélectivité du composé.

1.1. Elaboration de la première génération de dérivés de l'harmine

Etant donné l'activité antiproliférative très intéressante obtenue pour le composé **1o**, une vingtaine de nouvelles molécules trisubstituées par des groupements apolaires ainsi que leurs intermédiaires disubstitués en positions 7 et 9 (**2a-ac**) ont été synthétisées et caractérisées (synthèse et caractérisation réalisées par Christelle Vancraeynest, Namedic, UNamur). L'élaboration de cette première génération de molécules a permis de confirmer l'effet antiprolifératif plus important des molécules trisubstituées comparé à celui de l'harmine. En effet, les IC₅₀ obtenues pour les dérivés les plus puissants sont comprises entre 0,34 µM et 5 µM (l'ensemble des résultats se trouvent à l'**Annexe C**)[10]. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la littérature, montrant également un effet antiprolifératif de divers dérivés trisubstitués[58,63,64]. La structure des molécules **1o**, **2p** et **2t**, trois des molécules les plus actives, est présentée à la **Figure 12** et leur caractérisation est présentée au **Tableau 6**.

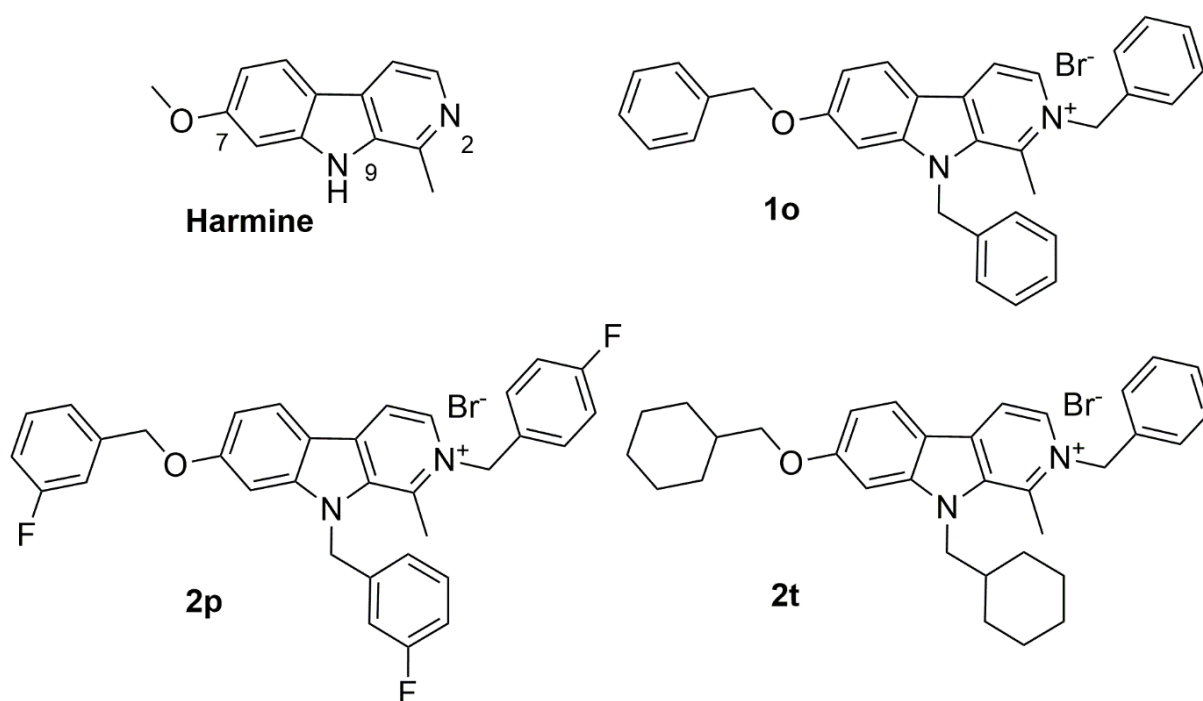


Figure 12: Structure des molécules **1o**, **2p** et **2t**.

Tableau 6: Concentration réduisant la viabilité cellulaire (IC_{50}) de 5 lignées de cellules cancéreuses humaines, solubilité cinétique mesurée au pH physiologique et lipophilie calculée (cLogP) pour les molécules **1o**, **2p** et **2t**.

Composé	Activité antiproliférative : IC_{50} (μM) ^a						Solubilité	
	Cellules d'astrogliomes		Cellules d'oligodendro-gliome	Cellules de tumeurs d'œsophage		Moyenne $\pm SD^b$	$\pm SD$	cLogP
	U373	T98G	Hs683	OE21	OE33		(pH 7,4 ; 25°C)	
							($\mu g \cdot mL^{-1}$)	
1o	0,44	0,48	0,49	1,3	0,7	0,7	73	5,27
	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,05$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	± 4	$\pm 1,51$
2p	0,9	1,9	4,5	2,9	3,4	2,7	2	5,39
	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 1,4$	± 1	$\pm 1,53$
2t	0,37	0,16	0,38	0,42	0,37	0,34	<2	6,73
	$\pm 0,02$	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,10$		$\pm 1,51$

^aLes valeurs d' IC_{50} ont été déterminées par le Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr. Véronique Mathieu). ^bSD : Déviation standard.

Dans la caractérisation de composés à visée thérapeutique, l'étude des propriétés physico-chimiques de nouvelles molécules est un paramètre à évaluer simultanément aux propriétés biologiques. Dès lors, la

solubilité cinétique des molécules au pH physiologique a été déterminée. Il est à noter que les valeurs de solubilité cinétique sont généralement supérieures aux valeurs de solubilité thermodynamique. Or, une valeur de solubilité thermodynamique supérieure à $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est considérée comme importante[97].

Les résultats présents dans le **Tableau 6** indiquent que les molécules **2p** et **2t** possèdent une solubilité cinétique médiocre ($<2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) défavorable au développement et à l'étude de ces nouvelles molécules antiprolifératives. La molécule **1o** possède une solubilité cinétique plus importante ($73\pm4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) que les molécules **2p** et **2t**. Cependant, étant donné que la valeur mesurée pour **1o** se trouve à la limite inférieure d'une solubilité thermodynamique importante, il serait intéressant d'accroître la solubilité des dérivés de l'harmine par l'ajout de nouveaux substituants.

Il est à noter que ces valeurs faibles de solubilité peuvent être corrélées à l'important logP calculé ($\text{cLogP}>5$) pour les trois molécules.

2. OPTIMISATION DES DÉRIVÉS ANTIPROLIFÉRATIFS

Si les dérivés de l'harmine trisubstitués, dits de « première génération », possèdent une activité antiproliférative intéressante, leur solubilité est médiocre. Dès lors, de nouvelles molécules trisubstituées seront synthétisées dans le but d'obtenir des composés préservant une bonne activité antiproliférative et associée à une meilleure solubilité au pH physiologique.

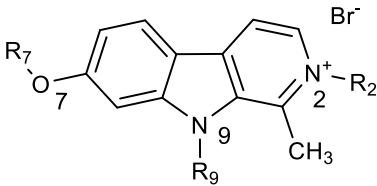
2.1. Elaboration de la deuxième génération de dérivés de l'harmine

Des groupements à caractère polaire, caractère non encore étudié jusqu'à présent, ont été introduits sur le squelette de l'harmine tels qu'un substituant chargé négativement au pH physiologique (groupement tétrazole-**4f**) ou un groupement polaire non chargé au pH physiologique (groupement hydroxy-**4g** et **4h**).

a) Caractérisation physico-chimique et biologique

Le **Tableau 7** présente la lipophilie calculée (cLogP) ainsi que la solubilité cinétique mesurée pour les composés **4f**, **4g** et **4h**. On remarque que les composés de la seconde génération possèdent une solubilité fortement améliorée ($>206 \mu\text{g.mL}^{-1}$) en comparaison aux molécules de la première génération ($<73 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Cette solubilité plus importante peut être reliée à une lipophilie fortement réduite ($\text{cLogP}<2$) par rapport aux molécules de première génération ($\text{cLogP}>5$).

Tableau 7: Structure, lipophilie calculée (cLogP) et solubilité cinétique mesurée pour les molécules **4f**, **4g** et **4h**.

Composé				cLogP	Solubilité (pH 7.4, 25°C) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
	R ₇	R ₉	R ₂		
4f	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ -tétrazole	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	1,86±1,54	ND ^a
4g	(CH ₂) ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	-1,11±1,51	>219
4h	(CH ₂) ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH	-2,6±1,52	>206

^aND : Non déterminé.

Grâce à un test permettant d'évaluer la viabilité cellulaire (test MTT), le pouvoir antiprolifératif des composés **4f**, **4g** et **4h** a été évalué sur deux lignées de cellules de gliomes (U373, Hs683), sur une lignée de cellules provenant d'un mélanome (SKMEL-28), sur une lignée provenant d'une tumeur du poumon (A549) et sur une lignée cellulaire provenant d'une tumeur du sein (MCF-7), après 72 heures d'incubation.

Les résultats présents dans le **Tableau 8** montrent que les composés étudiés ne sont pas actifs sur les différentes lignées étudiées, indépendamment de la présence d'une charge ou non au pH physiologique. En effet, comparé aux résultats obtenu avec l'harmine ($\text{IC}_{50}=28\pm3\mu\text{M}$), l'ajout de substituant polaire sur le noyau β -carboline, induit une perte de l'activité antiproliférative ($\text{IC}_{50}>100\mu\text{M}$). Ce résultat concorde avec la perte d'activité antiproliférative observée par Xu et ses collaborateurs lors de l'ajout d'un substituant 2-hydroxyéthyl en position 9 sur le squelette de l'harmine[6]. Ces informations permettent de réduire la gamme des substituants étudiés aux groupements à caractère apolaire.

Tableau 8: Activité antiproliférative (IC₅₀) déterminée *in vitro* sur cinq lignées de cellules cancéreuses, pour les molécules **4f**, **4g** et **4h**.

Composé	Activité antiproliférative : IC ₅₀ (μM) ^a					Moyenne
	Cellules de gliomes		Cellules de mélanome	Cellules de tumeur du poumon	Cellules de tumeur du sein	
	U373	Hs683	SKMEL-28	A549	MCF-7	
4f	ND ^b	>100	>100	>100	>100	>100
4g	>100	>100	>100	>100	>100	>100
4h	>100	>100	>100	51	>100	>90

^aLes valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées par le Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr. Véronique Mathieu). ^bND : Non déterminé.

2.2. Elaboration d'une relation structure tridimensionnelle-activité quantitative (3D-QSAR)

Les composés trisubstitués synthétisés jusqu'à présent ne combinent pas une activité antiproliférative de l'ordre du micromolaire et une importante solubilité au pH physiologique. Afin de rationaliser les données biologiques et structurales de l'ensemble des β-carbolines étudiées (**1a-o**, **2a-ac**, **4f-h**), un modèle CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) a été généré. Ce modèle met en lumière la relation entre l'activité antiproliférative, convertie en pIC₅₀ (-log IC₅₀) et la structure tridimensionnelle des composés.

Le modèle CoMFA, élaboré à partir des pIC₅₀ obtenus sur la lignée cellulaire de gliome humain Hs683, a été construit grâce au programme Sybyl 8.1[100] sur base de 80% des molécules (*training set*). Les 20% des molécules restantes ont, quant à elles, été utilisées afin de valider le modèle (*test set*). Ces molécules ont été choisies de manière aléatoire *via* le programme Discovery Studio 3.5[101].

a) Alignement des molécules

La première étape, qui est également l'une des étapes les plus importantes, consiste à aligner l'ensemble des molécules étudiées. Ainsi, les 48 structures des β-carbolines obtenues (inhibiteurs de MAO-A,

première et deuxième générations) ont été superposées sur un pharmacophore afin d'obtenir un alignement basé sur les substituants. Celui-ci a été réalisé en deux étapes dans le but de produire le meilleur alignement des molécules. Dans un premier temps, un premier pharmacophore a été établi avec les molécules **1o**, **2k** et **2z** comme *training set*. A partir de ce pharmacophore, les informations relatives au squelette commun (information du noyau β -carboline et la charge positive du pyridinium) ont été enlevées afin de générer un pharmacophore biais ne contenant des informations qu'au niveau des substituants. Dans un second temps, un deuxième pharmacophore a été généré à partir du pharmacophore biais et des molécules **2j**, **2t**, **2x** et **2aa** comme *training set*. L'alignement final de l'ensemble des molécules, réalisé avec le programme LigandScout 3.03[102], est présenté en **Figure 13**.

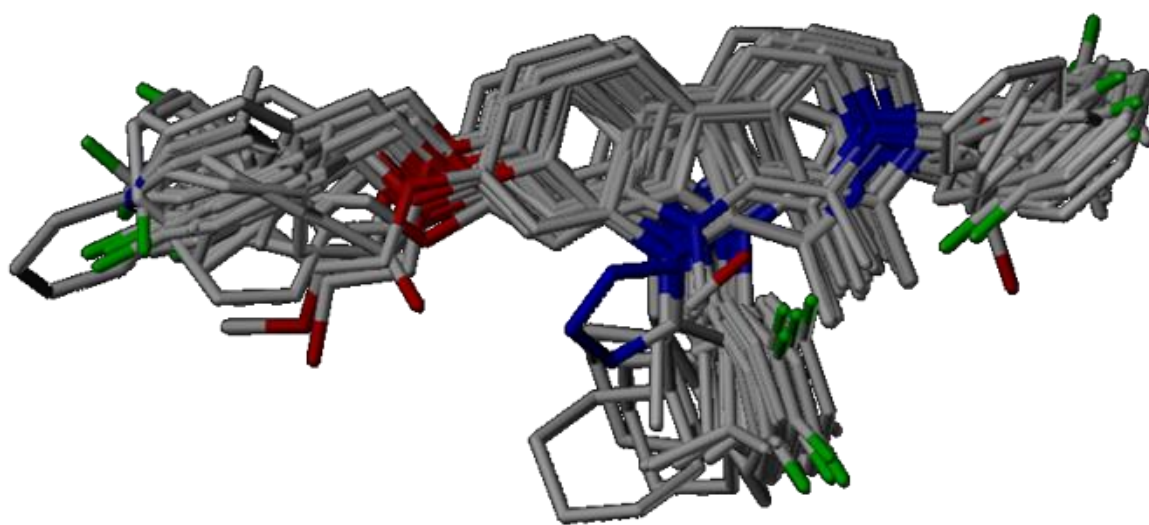


Figure 13: Alignement des molécules **1a-o**, **2a-ac**, **4f-h**, généré avec le programme LigandScout 3.03.

b) Détermination des valeurs d'énergie d'interaction

Une fois les molécules alignées, celles-ci sont placées dans une boîte (**Figure 14**). Un réseau y est créé et en chaque nœud de ce réseau, un atome sonde va permettre de calculer l'énergie d'interaction électrostatique (Coulomb) et l'énergie d'interaction stérique (Lennard-Jones), pour chaque molécule. Cette sonde est constituée d'une charge de +1.0 pour le calcul du champ électrostatique et d'un atome de carbone sp^3 avec un rayon de van der Waals de 1,52 Å pour le calcul du champ stérique.

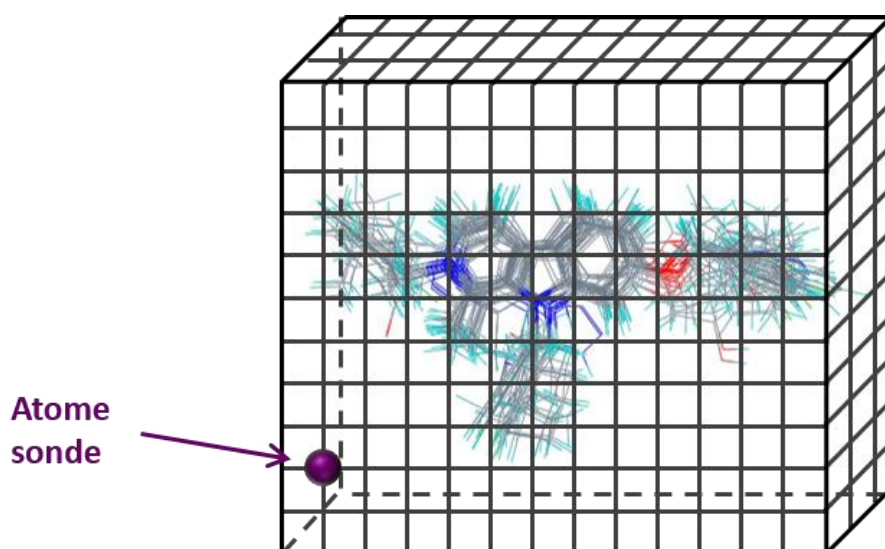


Figure 14: Calcul des énergies d'interaction stérique et des énergies d'interaction électrostatique.

c) Corrélation des données structures-activités

La corrélation entre les valeurs énergétiques calculées et les données biologiques expérimentales se réalise ensuite suivant la technique d'analyse des moindres carrés partiels. Cette technique permet de définir de nouvelles composantes qui sont des combinaisons linéaires des différentes variables.

Dans un premier temps, la technique de validation croisée a été utilisée afin de définir le nombre optimal de composantes (N) permettant d'obtenir le modèle dont la capacité de prédiction est la plus importante. Cette capacité de prédiction se traduit par une valeur de coefficient de corrélation de validation croisée (q^2) supérieure à 0,3, correspondant à une limite de confiance à 95%. En d'autres termes, la probabilité d'accepter une corrélation par la chance avec un q^2 égal ou supérieur à 0,3 est inférieure à 5% [103].

Dans un second temps, la technique de *bootstrapping* (« bien dans ses pompes ») permet de construire le modèle proprement dit, sur base du nombre optimal de composantes déterminé au préalable. Lors de cette validation, un coefficient de corrélation conventionnel (r^2) est déterminé. Celui-ci reflète la confiance que l'on peut accorder au modèle, et doit être le plus proche de 1. Une mesure de l'erreur standard d'estimation permet, quant à elle, de définir l'incertitude restante après réalisation du modèle et doit être la plus petite possible. La valeur obtenue par le test de Fisher établit le rapport de l'expliqué sur l'inexpliqué et doit être la plus grande possible.

Les résultats permettant de juger de la validité du modèle sont présentés dans le **Tableau 9**. Ces valeurs expriment un modèle prédictif pour lequel on peut avoir confiance ($q^2=0,397$, $r^2=0,872$). De plus, la

faible valeur d'erreur standard d'estimation ($ESE=0,314$) ainsi que la valeur élevée obtenue par le test de Fisher ($F=73,220$) montrent qu'une importante partie des données peuvent être expliquées par le modèle. Concernant les contributions stérique et électrostatique, celles-ci sont de même ordre avec des valeurs respectivement de 46,1% et 53,9%.

Tableau 9: Statistiques obtenues pour le modèle CoMFA.

	Validation croisée			<i>Bootstrapping</i>			
	q^2 ^a	N ^b	r^2 ^c	ESE ^d	F ^e	Contributions (%)	
						stérique	électrostatique
CoMFA	0,397	3	0,872	0,314	73,220	46,1	53,9

^aCoefficient de corrélation de validation croisée, ^bNombre optimal de composantes déterminé et utilisé lors du “*bootstrapping*”, ^ccoefficient de corrélation conventionnel, ^derreur standard d'estimation,

^eValeur obtenue par le test de Fisher.

La bonne corrélation entre les valeurs de pIC_{50} prédites et expérimentales pour les molécules du *training set* et du *test set* confirme également la capacité du modèle à prédire l'activité antiproliférative (pIC_{50}) (**Figure 15**) (les valeurs sont reprises en **Annexe D**).

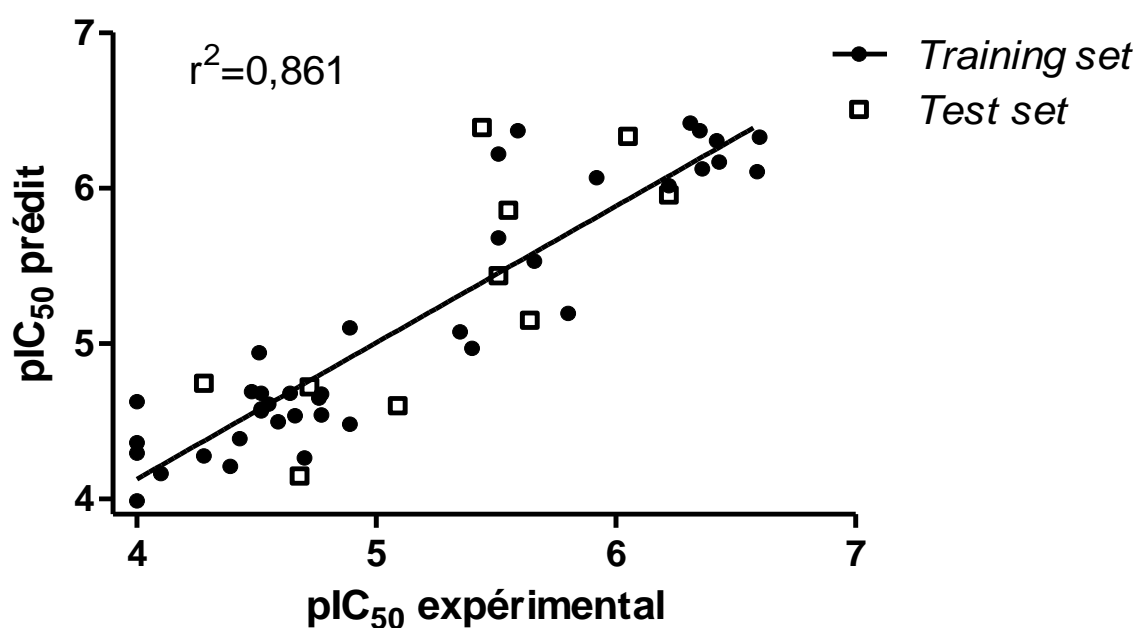


Figure 15: Corrélation entre les valeurs de pIC_{50} prédites et les valeurs de pIC_{50} obtenues expérimentalement sur les cellules Hs683, pour les molécules du *training set* et du *test set*.

d) Visualisation des cartes de contour

La visualisation des cartes de contour du modèle indique les différentes régions favorables ou défavorables à l'activité antiproliférative d'un point de vue stérique et électrostatique.

Ce modèle généré aidera ainsi à la conception de nouvelles molécules :

- De manière **qualitative** : la visualisation du modèle permettra de déterminer les caractéristiques structurales essentielles pour l'activité antiproliférative.
- De manière **quantitative** : les énergies d'interactions stériques et électrostatiques de chaque molécule conçue vont être déterminées après placement de la molécule dans le réseau. En utilisant la corrélation existante entre les données d'énergies et l'activité antiproliférative, une activité (en pIC_{50}) sera prédite pour ces molécules, avant la synthèse chimique.

Les cartes de contour sont présentées à la **Figure 16** et ont été dessinées autour de la molécule **1o**.

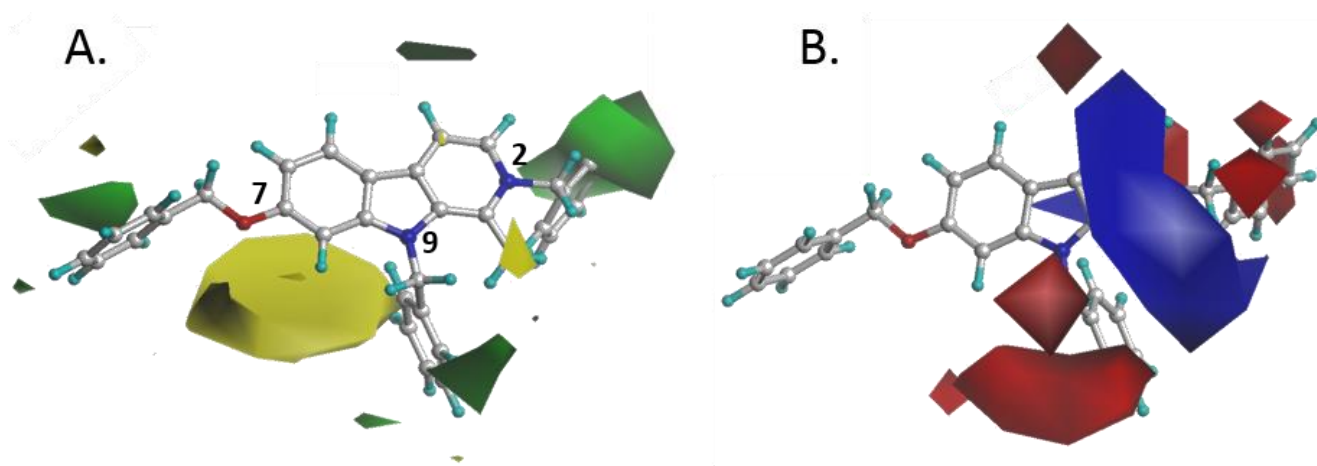


Figure 16: Carte de contour du modèle CoMFA autour de **1o**. (A) Champ stérique : les contours verts indiquent un emplacement favorable d'un groupement, d'un point de vue stérique, tandis que les contours jaunes indiquent un emplacement défavorable (B) Champ électrostatique : les contours bleus indiquent l'emplacement favorable pour une charge positive ou un groupement donneur de pont hydrogène, tandis que les contours rouges indiquent une région défavorable. Les isocontours favorables et défavorables représentent une contribution de 80% et 20% respectivement.

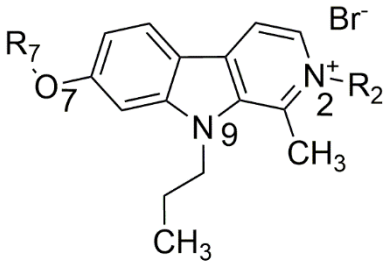
A partir de ces cartes de contour, plusieurs conclusions peuvent être tirées :

- La nature du substituant en position 7 a peu d'influence sur l'activité antiproliférative aussi bien d'un point de vue stérique que d'un point de vue électrostatique.
- Les substituants en positions 2 et 9 doivent être stériquement petits.
- La charge positive du pyridinium en position 2 est favorable à l'activité antiproliférative. Cette information reflète le caractère antiprolifératif marqué des composés trisubstitués puisque la présence d'un troisième substituant en position 2 entraîne automatiquement la présence d'une charge positive.

e) Conception de nouvelles molécules

A partir des observations tirées des cartes de contour et dans l'optique de diminuer la lipophilie de nouvelles molécules par rapport aux molécules de la première génération, divers petits substituants (éthyle, propyle, isobutyle, isopentyle et benzyle) ont été greffés sur le squelette de l'harmine. La combinaison de ces substituants a abouti à la conception de 12 nouvelles molécules dont la lipophilie calculée est plus faible ($cLogP < 3.4$) que celle de la première génération de molécules ($cLogP > 5$) (**Tableau 10**). De plus, l'activité antiproliférative sur la lignée cellulaire Hs683 prédite grâce au modèle CoMFA suggère que les molécules seraient actives dans la gamme du micromolaire. Parmi ces 12 molécules de troisième génération, trois d'entre elles, portant un groupement éthyle en position 2 (**5c**, **5g**, **5k**) sont prédites comme étant moins actives. Cependant, étant donné que ces molécules présentent des valeurs prédites d'activité et de lipophilie répondant à l'objectif de ce travail, elles seront synthétisées et incluses dans cette étude.

Tableau 10 : Structure, activité antiproliférative prédite (μM) sur Hs683 et lipophilie calculée (cLogP) pour les molécules de troisième génération.

Composés			Activité antiproliférative p rédite: IC ₅₀ prédite sur Hs683 (μM)	cLogP
	R ₇	R ₂		
5c	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	18,6	2,09±1,51
5d	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	2,0	2,20±1,51
5e	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(CH ₂)CH(CH ₃) ₂	2,4	2,15±1,51
5f	CH ₂ CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	3,4	2,46±1,51
5g	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₃	7,5	2,36±1,51
5h	CH ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂ CH ₃	1,1	2,47±1,51
5i	CH ₂ C ₆ H ₅	(CH ₂)CH(CH ₃) ₂	1,8	2,43±1,51
5j	CH ₂ C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	1,0	2,74±1,51
5k	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₃	11,1	2,95±1,51
5l	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₂ CH ₃	1,9	3,06±1,51
5m	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	(CH ₂)CH(CH ₃) ₂	1,3	3,01±1,51
5n	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ CH(CH ₃) ₂	1,6	3,32±1,51

2.3. Etude de la troisième génération de dérivés de l'harmine

a) Caractérisation physico-chimique et biologique

Les valeurs de solubilité cinétique des différentes molécules conçues et synthétisées (**Tableau 11**) montrent que l'addition de substituant apolaire branché/non branché permet d'augmenter la solubilité des molécules ($>164 \mu\text{g.mL}^{-1}$), par rapport aux molécules pharmacologiquement actives de la première génération portant des groupements aromatiques et/ou cyclohexyles ($<73 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ceci peut être mis en lien avec la diminution de lipophilie calculée pour ces molécules de la troisième génération (cLogP <3.4).

Tableau 11: Mesure de l'activité antiproliférative *in vitro* (IC₅₀) sur cinq lignées de cellules cancéreuses humaines et solubilité cinétique mesurée pour les molécules **5c**, **5f-g**, **5i-l**, **5m**.

Composés ^a	Solubilité ± SD ^c (pH 7,4 ; 25°C) (µg.mL ⁻¹)	Activité antiproliférative : IC ₅₀ (µM) ^b					Moyenne ± SD
		Cellules gliomes			Cellules mélanome	Cellules tumeur poumon	
		U373	Hs683	T98G	SKMEL-28	A549	
5c	174±6	35	2	22	8	0,7	13 ± 15
5f	196±5	22	1	4	3	2	6 ± 9
5g	207±4	22	3	11	4	2	8 ± 8
5i	207±4	1,0	0,4	3,8	0,6	0,8	1,3 ± 1,4
5j	164±6	2	0,3	1,5	1	0,3	1,0 ± 0,7
5k	186±5	0,6	0,09	0,9	1,0	0,2	0,6 ± 0,4
5l	185±2	0,6	0,04	1,2	0,9	0,3	0,6 ± 0,4
5n	189±13	0,2	<0,01	0,7	0,4	0,1	<0,3

^aLes molécules **5d**, **5e**, **5h** et **5m** présentaient une pureté <95% ou ont été obtenues en trop faible quantité. Dès lors, ces molécules n'ont pas été étudiées. ^bLes valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées par le Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr. Véronique Mathieu). ^cSD : Déviation standard.

La détermination de la concentration permettant de diminuer la viabilité cellulaire de 50% (**Tableau 11**) montre que les composés de troisième génération (**5c**, **5f-g**, **5i-l**, **5m**) sont nettement plus actifs (0,3 µM < IC₅₀ < 13 µM) que l'harmine (IC₅₀ = 28 ± 3 µM) et que ceux de la seconde génération (IC₅₀ > 100 µM). En effet, les molécules présentent une activité antiproliférative de l'ordre du micromolaire (**5c**, **5f-g**, **5i-j**) à submicromolaire (**5k-l**, **5n**) sur les cinq lignées de cellules cancéreuses. Deux observations peuvent être mises en évidence :

- Pour un même substituant en positions 2 et 9, l'IC₅₀ est divisée par 20 lorsque le substituant en position 7 est branché (**5c** vs **5k** et **5f** vs **5n**).
- Pour un substituant en position 7 branché, l'addition d'un substituant branché en position 2 permet de diminuer l'IC₅₀ moyenne (**5k-l**, **5n**).

Il est à noter que l'activité antiproliférative prédite sur Hs683 pour les molécules les plus actives (**5k-l**, **5n**) est plus faible de un à deux ordres de grandeur par rapport à l'activité antiproliférative obtenue expérimentalement sur cette même lignée de cellules cancéreuses. Cette observation met en lumière la sous-estimation du pouvoir antiprolifératif du modèle pour de basses IC_{50} . Ceci peut être expliqué par le fait qu'aucune des molécules constituant le *training set* n'était aussi puissantes que les molécules **5k-l**, **5n**, nouvellement synthétisées. Cependant, les molécules ont été prédites comme étant actives, ce qui se confirme expérimentalement. Ces résultats permettent de valider l'utilisation du modèle pour la prédiction de nouvelles molécules.

De par l'activité antiproliférative intéressante de ces molécules, un brevet a été déposé, décrivant, notamment, les résultats obtenus pour ces nouveaux composés[104,105].

Sur base des activités antiprolifératives obtenues, la molécule **5n**, possédant l'activité antiproliférative moyenne la plus importante ($IC_{50} < 0,3 \mu M$), a été choisie et une étude plus approfondie sera réalisée afin de, notamment, déterminer ses propriétés pharmacologiques.

3. ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION

Tout au long de ce travail, deux approches ont été abordées afin de tenter de déterminer le mécanisme d'action de ces nouvelles molécules antiprolifératives. La première se focalise sur la connaissance des mécanismes antiprolifératifs induits par l'harmine. La seconde approche consiste à comparer le profil antiprolifératif des composés sur différentes lignées de cellules cancéreuses, avec ceux de la banque de données du *National Cancer Institute* (NCI)[106].

3.1. Approche focalisée sur les mécanismes d'action de l'harmine

Comme cela a été décrit dans l'introduction, l'harmine possède différents mécanismes d'action entraînant un effet antiprolifératif. Parmi ceux-ci, l'harmine est un inhibiteur puissant de la kinase DYRK1A[26–28] et un agent intercalant de l'ADN[35,42]. Se basant sur ces observations, ces effets seront évalués afin de déterminer si les nouveaux composés antiprolifératifs trisubstitués partagent ces propriétés.

a) Etude de l'inhibition de DYRK1A

Le pouvoir inhibiteur sur DYRK1A a été évalué en présence des composés trisubstitués de l'harmine **1o** et **2t**, deux composés présentant une activité antiproliférative submicromolaire ($IC_{50} = 0,7 \pm 0,4 \mu M$ et $0,34 \pm 0,10 \mu M$ respectivement). Les résultats du **Tableau 12**, montrent que l'ajout de substituants sur le squelette de l'harmine augmente fortement l' IC_{50} sur DYRK1A. Ces molécules **1o** et **2t** ne sont donc pas des inhibiteurs de la kinase. A partir de la visualisation du complexe harmine-DYRK1A obtenu par cristallographie (PDB : 3ANR), présenté en **Figure 17**, on peut conclure que le volume trop important des molécules **1o** et **2t** dû à la présence des substituants en positions 2 et 7, empêche celles-ci de se lier au même site de liaison que l'harmine.

Tableau 12: Inhibition de DYRK1A (IC_{50} , μM) et concentration permettant de diminuer la viabilité cellulaire de 50% des dérivés de l'harmine.

Composés	Inhibition DYRK1A, IC_{50} (μM)	Activité antiproliférative : IC_{50} moyenne \pm SD ^a (μM)
Harmine	0,08[26]	28 \pm 3
1o	21	0,7 \pm 0,4
2t	43	0,34 \pm 0,10

^aSD : Déviation standard

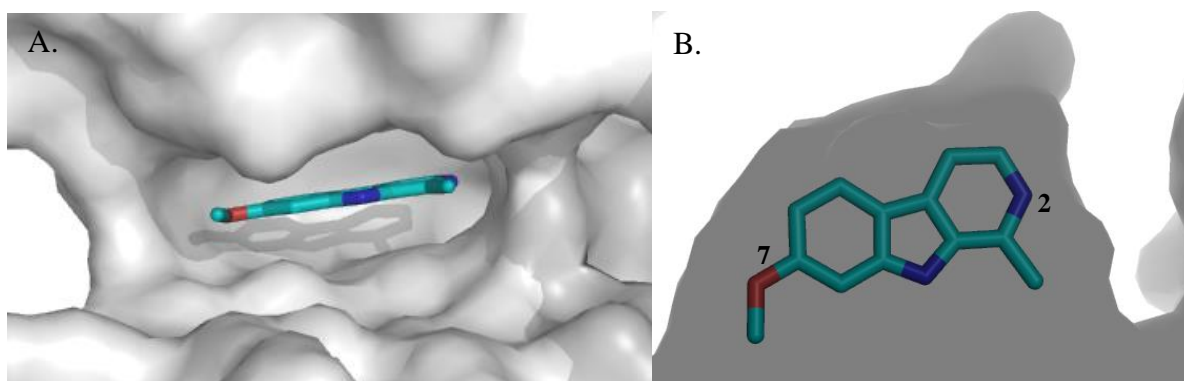


Figure 17: Complexe harmine-DYRK1A (PDB: 3ANR). (A) Vue de face (B) Vue au sein de la protéine.

Etant donné que l'harmine se lie dans le site de liaison de l'ATP de la kinase DYRK1A, l'inhibition par une autre molécule trisubstituée, **2p** ($IC_{50} = 2,7 \pm 1,4 \mu M$), a été étudiée à $10 \mu M$ sur 358 protéines kinases et 10 lipides kinases. Les résultats montrent que **2p** induit une inhibition de plus de 90% sur onze kinases impliquées principalement dans la prolifération cellulaire des tumeurs[10]. Ces résultats pourraient

expliquer notamment le pouvoir antiprolifératif observé pour la molécule **2p**. Il est intéressant de noter que **2p** n'est pas un inhibiteur de la protéine kinase PLK1, contrairement aux molécules trisubstituées décrites par Si et ses collaborateurs[65] et présentées dans l'introduction.

b) Etude de l'intercalation dans les brins d'ADN

La température de fusion de l'ADN (T_M de l'anglais *Melting Temperature*) correspond à la température pour laquelle 50% des molécules d'ADN sont sous forme double brin et 50% des molécules sont sous forme simple brin. En présence d'un agent intercalant de l'ADN, les interactions entre les molécules vont stabiliser l'ADN et une énergie plus importante devra être fournie pour dénaturer la double hélice. Cela se traduit par une augmentation de la température de fusion de l'ADN (**Figure 18**). La différence de température de fusion en présence et en absence de composé (ΔT_m) permettra de définir le pouvoir intercalant du composé étudié. Plus cette valeur est importante, plus l'agent intercalant est puissant.

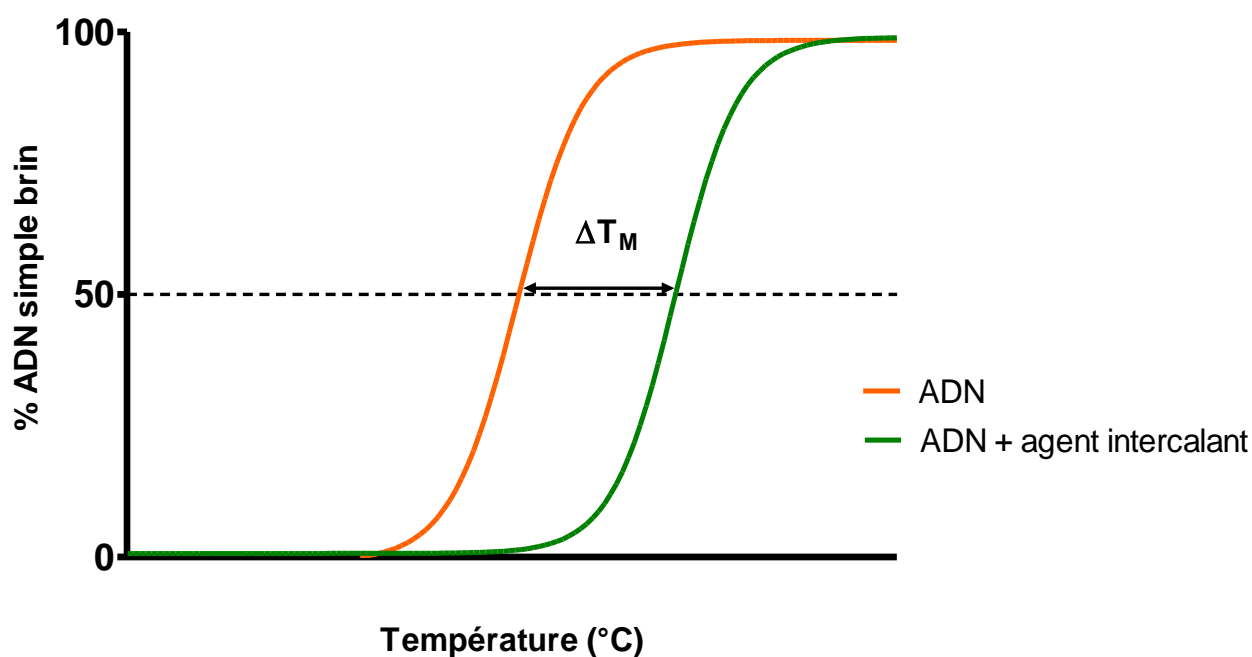


Figure 18: Schéma représentant l'augmentation du pourcentage d'ADN simple brin en fonction de la température, en absence (orange) et en présence (vert) d'un agent intercalant. La variation de température est définie par $\Delta T_M = T_M (\text{ADN} + \text{composé}) - T_M (\text{ADN})$. Schéma adapté de [107].

L'harmine étant décrite comme un agent intercalant de l'ADN[35,42], le pouvoir intercalant des dérivés trisubstitués a été évalué[108]. La **Figure 19** présente la différence de température de fusion de l'ADN (ΔT_M) pour l'harmine et les molécules trisubstituées **1o**, **2p** et **5n**, comparée à celle de la doxorubicine, composé de référence.

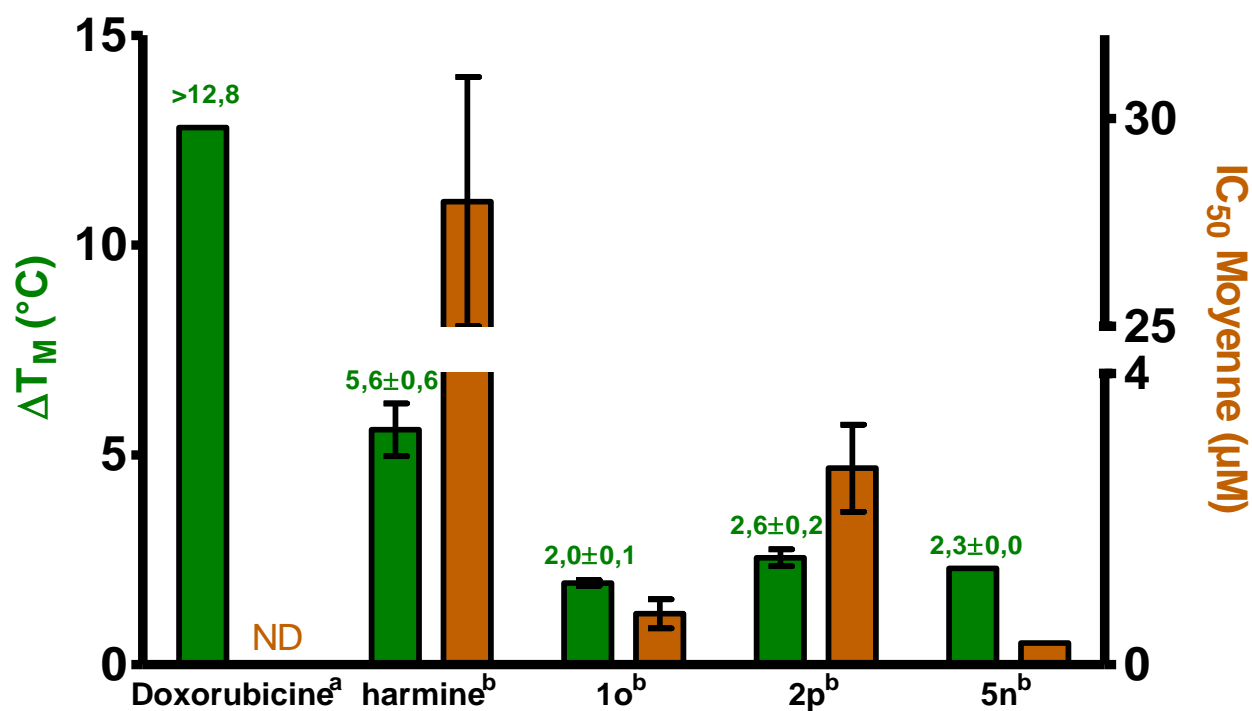


Figure 19: Corrélation entre les différences de température de fusion de l'ADN (ΔT_m) mesurées en présence des composés étudiés et l'IC₅₀ moyenne obtenue sur cinq lignées de cellules cancéreuses humaines. Rapport ADN: drogue équivalent à ^a1:4 ^b1 :2. ND : Valeurs non déterminées.

A partir des résultats présents à la **Figure 19**, on remarque, d'une part, que le pouvoir intercalant de l'harmine et de ses dérivés est plus faible que celui de la doxorubicine, agent intercalant de référence. Cette différence est d'autant plus marquée que la concentration en doxorubicine utilisée pour le test est deux fois plus faible (rapport ADN : drogue de 1 : 4) que celle utilisée pour l'harmine et ses dérivés (rapport ADN : drogue de 1 : 2).

D'autre part, on remarque que le pouvoir intercalant des dérivés **1o**, **2p** et **5n** est inférieur ($2,0 < \Delta T_M < 2,6$) à celui de l'harmine ($\Delta T_M = 5,6$) alors que l'activité antiproliférative de ces molécules trisubstituées est nettement plus importante que celle de l'harmine. On peut, dès lors, conclure que l'intercalation des composés au sein de la double hélice d'ADN n'est pas le mécanisme d'action principal par lequel les composés induisent un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses.

3.2. Approche comparative basée sur l'évaluation du profil antiprolifératif

En parallèle de la première étude, une approche exploratoire basée sur l'évaluation du profil antiprolifératif a été abordée. Cette approche se base sur l'observation que des molécules possédant un profil d'inhibition de croissance cellulaire semblable partagent un mécanisme d'action similaire[109,110]. Dès lors, cette étude aura pour but de déterminer et de comparer les profils antiprolifératifs des composés trisubstitués avec ceux des molécules peuplant la banque de données du Programme de Développement Thérapeutique du *National Cancer Institute* (NCI) dont le mode d'action de certaines d'entre elles est connu.

a) Evaluation du profil antiprolifératif des composés **1o**, **2p** et **2t**

Dans le cadre du Programme de Développement Thérapeutique du NCI, le profil antiprolifératif de composés est évalué sur 60 lignées de cellules humaines, permettant ainsi d'étudier l'effet des composés sur un panel diversifié de cellules cancéreuses. En effet, ces lignées proviennent des cellules leucémiques et de mélanomes ainsi que des cancers du poumons, du colon, du système nerveux central, de l'ovaire, du rein, de la prostate et du sein [111].

La **Figure 20** présente le profil antiprolifératif des composés **1o**, **2p** et **2t** sur les 60 lignées de cellules cancéreuses. Les valeurs positives correspondent à un pourcentage de croissance cellulaire tandis que les valeurs négatives correspondent à un pourcentage de mort cellulaire, observé après une incubation des composés à 10 μ M, pendant 48 heures.

Dans cette étude, deux types de profils apparaissent (**Figure 20**). Le premier correspond aux molécules **1o** et **2p**, dont les comportements ne sont pas significativement différents ($p>0.05$). Ces deux molécules présentent, sur les 60 lignées de cellules cancéreuses testées, un pourcentage de mort cellulaire moyen de, respectivement, 45% et 58%, avec d'importantes variations entre les lignées. Par contre, la molécule **2t** présente une mort cellulaire moyenne de 82% sur les 60 lignées de cellules cancéreuses, et ce, avec de faibles variations entre les différentes lignées de cellules. Le comportement de **2t** est significativement différent du comportement des molécules **1o** et **2p** ($p<0.001$). La mise en évidence de ces deux types de profil suggère des mécanismes d'action différents.

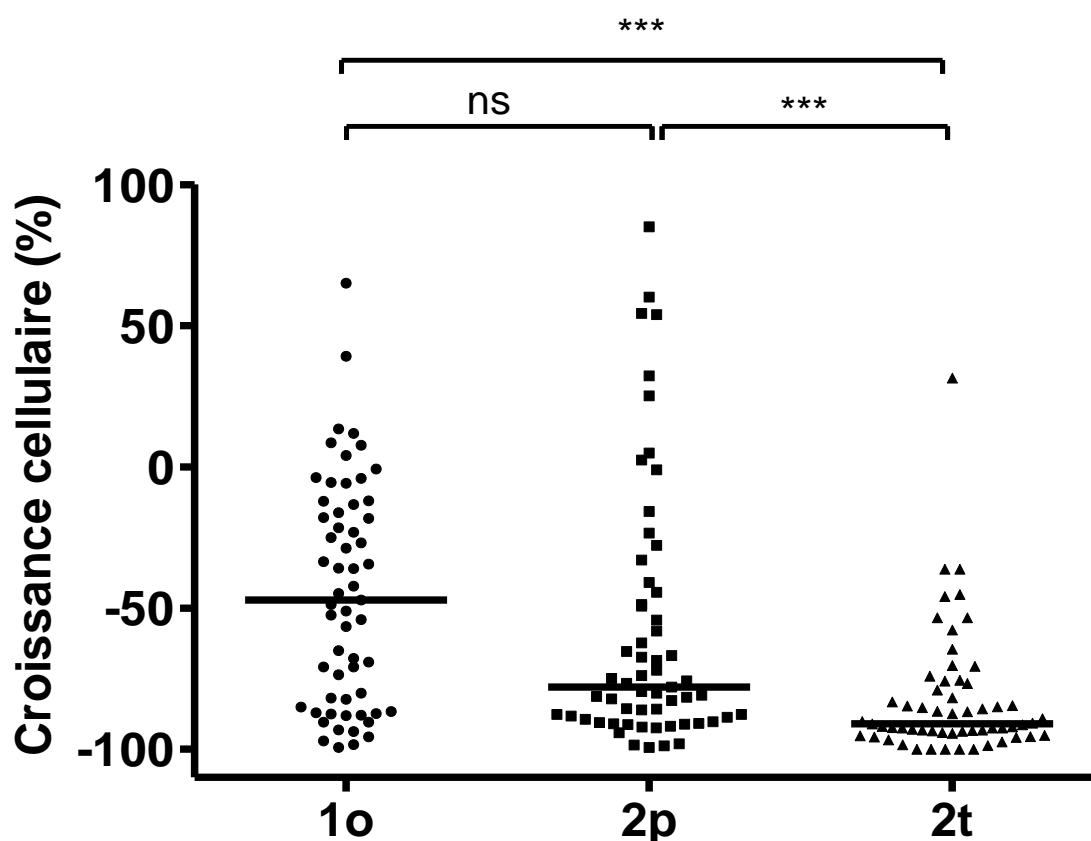


Figure 20: Croissance cellulaire mesurée sur 60 lignées de cellules cancéreuses, après 48 heures d'incubation en présence de **1o**, **2p** et **2t** (10 μM), comparée à la médiane. Une valeur positive de croissance traduit un pourcentage de croissance, une valeur négative de croissance traduit un pourcentage de mort cellulaire. Les analyses statistiques (valeur de p) ont été déterminées par un test de Kruskal-Wallis. NS : différence non significative ($p > 0,05$), *** différence significative ($p < 0,001$).

b) Comparaison des profils d'inhibition de croissance cellulaire – algorithme COMPARE

Une seconde analyse a été réalisée afin d'étudier ces composés sur les mêmes lignées de cellules cancéreuses humaines que celles utilisées précédemment, et ce, à cinq concentrations différentes. Cette analyse a permis de définir la concentration permettant de réduire la croissance cellulaire de 50% (GI_{50}), et ce, sur chaque lignée de cellules étudiées. Ces valeurs de GI_{50} ont ensuite été comparées aux GI_{50} obtenues pour l'ensemble des molécules composant la banque de données du NCI (>763 000 composés) via l'algorithme COMPARE, développé par le NCI. Cette approche a déjà été utilisée par différentes équipes et a permis de mettre en évidence notamment de nouveaux inhibiteurs de la polymérisation de

la tubuline[112], des inhibiteurs de kinases cyclines- dépendantes[113], des inhibiteurs de la topoisomérase I[114] ou encore des inhibiteurs de la synthèse protéique[115].

Les résultats obtenus présentent la similarité de profil antiprolifératif des molécules sous forme de coefficient de corrélation de Pearson. Plus ce coefficient de corrélation est important, plus le profil des deux composés est similaire.

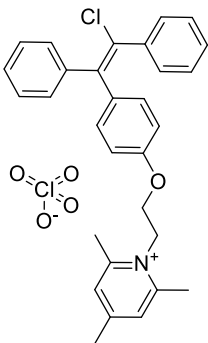
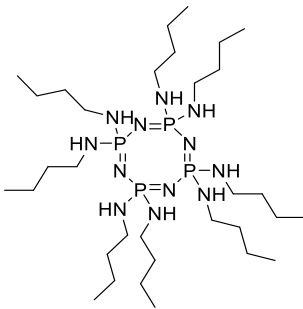
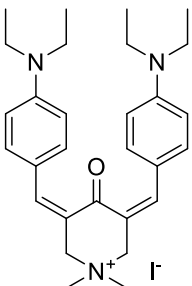
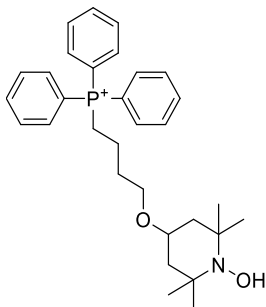
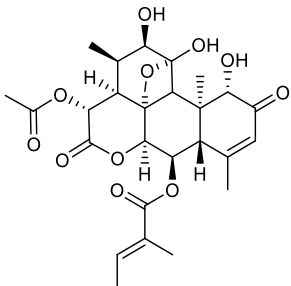
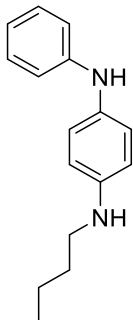
Le **Tableau 13** présente la structure et le mécanisme d'action des cinq molécules possédant le coefficient de corrélation de Pearson le plus élevé vis-à-vis des molécules **1o** et **2t**.

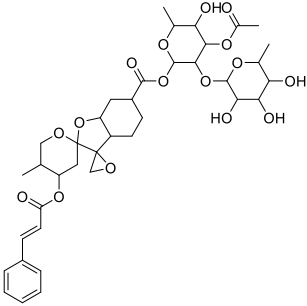
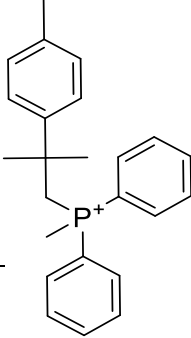
On remarque que pour **1o**, la corrélation avec ces cinq molécules est supérieure à 82%. De plus, **1o** corrèle principalement avec des molécules décrites comme étant des inhibiteurs de la synthèse protéique. En effet, le composé NCS634791 a été mis en évidence lors d'une étude COMPARE réalisée afin de déterminer des inhibiteurs de la synthèse protéique. Les composés NCS267709 (undulatone) et NCS342443 (phyllantoside) sont décrits comme étant des inhibiteurs de la synthèse protéique[115]. Par contre, le mécanisme d'action de la molécule NCS644614 n'est pas connu.

Le composé **2t** possède une corrélation plus faible ($<0,78$) avec cinq autres molécules, dont aucune d'entre elles n'intervient dans l'inhibition de la synthèse protéique. La molécule NCS747162 possède des propriétés antioxydantes[116,117] alors que la molécule NCS24030 inhibe la mort neuronale induite par le glutamate[118]. Le mécanisme d'action des autres molécules n'est, par contre, pas connu.

On remarque également que le coefficient de corrélation de Pearson est de 0,72 entre **1o** et **2t** alors qu'il est de 0,82 entre **1o** et **2p** (**Tableau 13**). Cette dernière information renforce l'hypothèse de l'existence de deux mécanismes différents entre les molécules **1o** et **2p** d'une part, et **2t** d'autre part.

Tableau 13: Structure et mécanisme d'action des cinq molécules possédant le coefficient de corrélation de Pearson le plus élevé en corrélation vis-à-vis des molécules **1o** et **2t**.

1o			2t		
Coeff. de corrélation de Pearson	Composé	Information	Coeff. de corrélation de Pearson	Composé	Information
0,85	<p>NCS644614</p> 	Mécanisme inconnu	0,78	<p>NCS58924</p> 	Mécanisme inconnu
0,85	<p>NCS634791</p> 	Inhibiteur de la synthèse protéique [115]	0,73	<p>NCS747162</p> 	Propriété antioxydante [116,117]
0,83	<p>NCS267709 (undulatone)</p> 	Inhibiteur de la synthèse protéique [115]	0,73	<p>NCS24030</p> 	Inhibiteur de mort neuronal induite par le glutamate [118]

1o			2t		
Coeff. de corrélation de Pearson	Composé	Information	Coeff. de corrélation de Pearson	Composé	Information
0,83	NCS342443 (phyllantoside) 	Inhibiteur de la synthèse protéique [115]	0,73	NCS176098 	Mécanisme inconnu
0,82	2p	Mécanisme inconnu	0,72	1o	Mécanisme inconnu

c) Confirmation du mécanisme d’action

Afin de confirmer l’action des molécules **1o** et **2p** en tant qu’inhibiteurs de la synthèse protéique, l’analyse, par Western Blot, de l’expression de la sous unité du facteur d’initiation de la synthèse protéique (eiF2 α) phosphorylée et non phosphorylée a été réalisée, par nos collaborateurs de l’Université Libre de Bruxelles (ULB), sur les cellules cancéreuses de gliomes Hs683 et U373 (**Figure 21**)[119]. Les résultats montrent que les molécules **1o** et **2p** induisent une diminution de l’expression de la sous-unité eiF2 α au cours du temps, sur les lignées de gliomes Hs683 et U373, contrairement à **2t**. Ce résultat permet de confirmer l’implication des molécules **1o** et **2p** dans l’inhibition de la synthèse protéique.

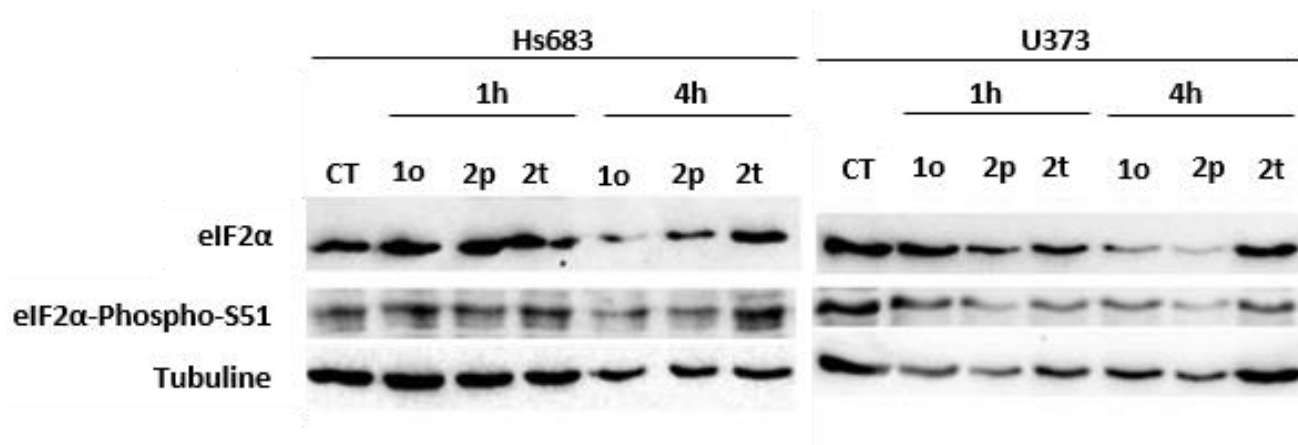


Figure 21: Analyse de l'expression de la protéine eIF2α et de la protéine eIF2α phosphorylée après 1 heure et 4 heures d'incubation en présence des molécules **1o**, **2p** et **2t** et sur les lignées de cellules cancéreuses humaines de gliomes Hs683 et U373, en comparaison aux résultats en absence de composé (CT). La concentration utilisée est celle de l'IC₅₀ déterminée lors du test de viabilité cellulaire (test MTT), soit, respectivement de 0,5μM, 5μM et 0,5μM sur Hs683 et de 0,5μM, 1μM et 0,5μM sur U373.

Récemment, une analyse similaire a été réalisée sur **5n**, montrant également son implication dans l'inhibition de la synthèse protéique. Etant donné les propriétés antiprolifératives et physico-chimiques intéressantes de **5n**, découverte dans le cadre de ce travail, une thèse de doctorat au sein du Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr. Véronique Mathieu) a été entamée afin de déterminer le mode d'inhibition de **5n** au niveau de la synthèse protéique.

4. CONCLUSIONS

L'harmine possède une activité antiproliférative *in vitro* et une activité anticancéreuse *in vivo* résultantes de plusieurs mécanismes d'action. Dès lors, dans le but de concevoir de nouveaux dérivés antiprolifératifs, les molécules dérivées de l'harmine synthétisées et étudiées dans le cadre d'un projet ayant pour but de concevoir des inhibiteurs de MAO-A ont été testées. La détermination de la viabilité cellulaire de cinq lignées de cellules cancéreuses, en présence des différents dérivés mono-, di-, et trisubstitués a été réalisée. Ce test a mis en lumière l'important pouvoir antiprolifératif des molécules trisubstituées en positions 2, 7 et 9. Ceci a été confirmé par la synthèse et la caractérisation d'une vingtaine de nouvelles molécules trisubstituées par des groupements apolaires. Cependant, malgré une activité antiproliférative de l'ordre du micromolaire à submicromolaire, les meilleurs composés obtenus

lors de cette première génération de molécules (**1o**, **2p**, **2t**) présentait une trop faible solubilité cinétique au pH physiologique ($<73 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Une seconde génération de molécules portant des substituants polaires (**4f-h**) a montré une augmentation importante de la solubilité ($>206 \mu\text{g.mL}^{-1}$) comparée aux molécules **1o**, **2p** et **2t**. Cependant, ces molécules de seconde génération étaient inactives ($\text{IC}_{50}>100\mu\text{M}$) sur les différentes lignées de cellules cancéreuses étudiées, permettant de limiter la gamme de substituants étudiés aux groupements apolaires.

Afin de rationaliser l'ensemble des résultats obtenus sur les première et deuxième générations de molécules, un modèle 3D-QSAR a été élaboré. Ce modèle relie l'activité antiproliférative des molécules sur la lignée de cellules de gliomes humains Hs683 à leur structure tridimensionnelle. Il montre de bonnes statistiques de prédiction ($q^2=0,397$, $r^2=0,872$) et a permis de guider la synthèse de 12 nouvelles molécules dont l'activité antiproliférative et la lipophilie prédite répondaient à l'objectif du travail. Ces prédictions ont été confirmées par les caractérisations biologique et physico-chimique des molécules synthétisées. En effet, celles-ci combinent une activité antiproliférative de l'ordre du micromolaire à submicromolaire sur les cinq lignées de cellules cancéreuses testées ($0,3 \mu\text{M}<\text{IC}_{50}<13 \mu\text{M}$) et une importante solubilité au pH physiologique ($>164 \mu\text{g.mL}^{-1}$). De cette étude, le composé **5n** (**Figure 22**) apparaît comme le plus intéressant ($\text{IC}_{50}<0,3 \mu\text{M}$) et sera étudié de manière plus approfondie dans la seconde partie de ce travail.

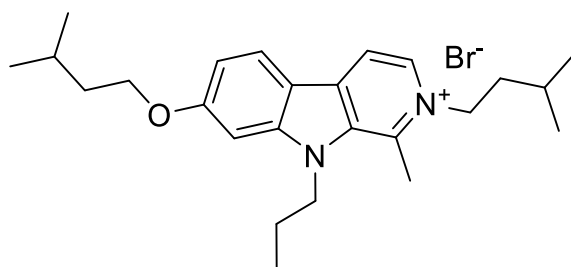


Figure 22: Structure du composé **5n**.

Afin de déterminer le mécanisme d'action de ces nouvelles molécules originales, deux approches ont été élaborées. Une première approche se focalisant sur les mécanismes d'action connus de l'harmine a montré que les dérivés trisubstitués n'étaient pas des inhibiteurs de MAO-A, de DYRK1A ou des agents intercalants de l'ADN, contrairement à l'harmine.

Une seconde approche a consisté en l'étude des profils antiprolifératifs des composés **1o**, **2p** et **2t** sur 60 lignées de cellules cancéreuses du Programme de Développement Thérapeutique du NCI. La

comparaison de ces profils avec ceux de la banque de données du NCI a permis de mettre en évidence un mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique pour les molécules **1o** et **2p**, mode d'action qui ne serait pas partagé par la molécule **2t**. Une analyse de l'expression de la sous unité du facteur d'initiation de la synthèse protéique (eIF2 α) a confirmé cette hypothèse. La molécule **5n** serait également un inhibiteur de la synthèse protéique. Une étude, encadrée par le Pr. Véronique Mathieu, est actuellement en cours au sein du Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB afin de confirmer cette hypothèse.

Partie 2 :

Evaluation pharmacologique et toxicologique de 5n

1. ÉTUDE *IN SILICO*

Un des objectifs de ce travail est d'obtenir une molécule ciblant le gliome, cancer très agressif avec l'un des taux de survie sur 5 ans les plus faibles (19%) entre 2010 et 2011[98]. Il est donc essentiel que le **5n** traverse la barrière hématoencéphalique (BHE). Un modèle prédictif du passage de composé à travers la BHE, présent au sein du programme Discovery Studio 4.0[101], a été utilisé afin de définir le pouvoir pénétrant de **5n**. Le programme calcule les propriétés physico-chimiques du composé afin de les comparer au modèle. Ce dernier a été généré à partir 102 composés et a été validé en utilisant deux banques de données de molécules dont le caractère pénétrant de la BHE est connu[101] (Les détails sont présentés dans la section Partie expérimentale).

Les résultats ont mis en évidence un caractère très pénétrant de **5n**, avec un rapport 5 :1 $[\mathbf{5n}]_{\text{cerveau}} : [\mathbf{5n}]_{\text{sang}}$, ce qui permet de confirmer l'intérêt de cette molécule dans le développement d'un traitement pour le gliome.

2. ÉTUDE *IN VITRO*

2.1. Toxicité sélective du 5n sur les cellules cancéreuses versus les cellules saines

Dans le but de déterminer la toxicité *in vitro* de **5n**, un test de viabilité cellulaire a été réalisé (test MTT) afin de comparer les effets de **5n** sur des cellules saines (cellules endothéliales primaires humaines (HUVEC) et fibroblastes de peau humaine (BJ)) ainsi que sur des cellules cancéreuses (cellules de carcinome pulmonaire humain (A549)). Le test de viabilité utilisé met en évidence la capacité de métabolisation de la cellule après 3 jours d'incubation des cellules à 37°C en présence de **5n**, à différentes concentrations (**Figure 23**). A partir de ces résultats, l'IC₅₀ induite par la molécule sur les différentes lignées de cellules ainsi que l'indice de sélectivité ont été calculés (**Tableau 14**).

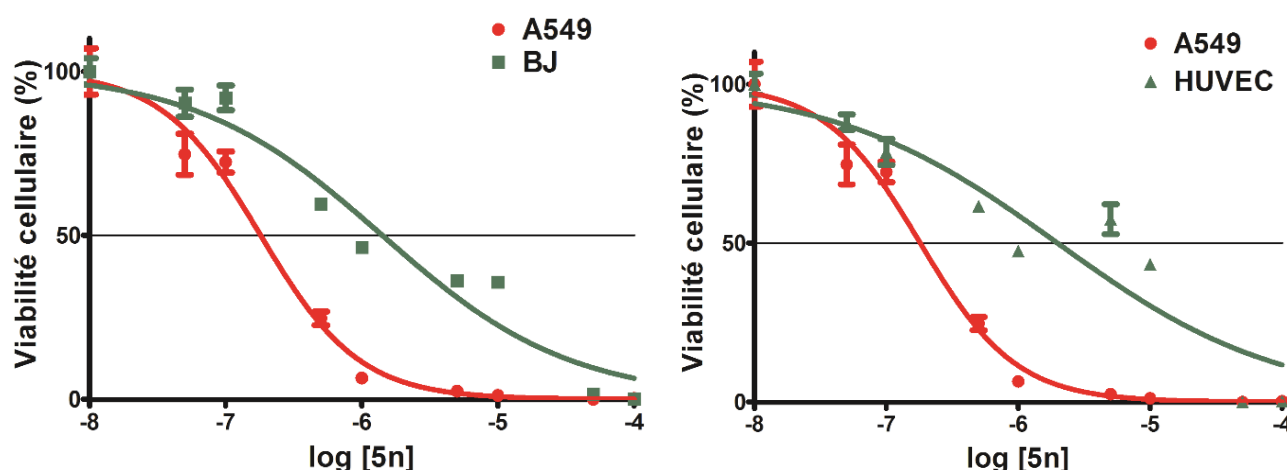


Figure 23: Viabilité cellulaire déterminée après 72 heures d'incubation de **5n** avec des cellules cancéreuses du poumon (A549), des fibroblastes de peau humaine (BJ) et des cellules endothéliales humaines (HUVEC).

Tableau 14: Activité antiproliférative (IC_{50}) (μM) déterminée sur des cellules cancéreuses (A549) et cellules saines (BJ et HUVEC) en présence de **5n**.

Type de cellules	Activité antiproliférative : IC_{50} (μM)	Intervalle de confiance à 95% (μM)	Indice de sélectivité ^a
Carcinome pulmonaire (A549)	0,20	0,15 – 0,21	-
Fibroblastes cutanés (BJ)	1,6	1,1 – 1,8	8
Cellules endothéliales (HUVEC)	2,0	1,3 – 2,9	10

^aL'indice de sélectivité est déterminé en comparant l' IC_{50} (μM) obtenue sur les cellules saines avec celle obtenue sur les cellules cancéreuses A549.

A partir des résultats présentés à la **Figure 23** et dans le **Tableau 14**, on constate, d'une part, un comportement similaire des cellules saines de type BJ et HUVEC en présence de **5n**. En effet, les valeurs d' IC_{50} sur ces lignées cellulaires saines sont, respectivement, de 1,6 μM et 2,0 μM . D'autre part, on remarque que les cellules cancéreuses A549 sont plus sensibles à la présence de **5n**, en comparaison aux cellules saines. En effet, une dose plus faible d'un ordre de grandeur est suffisante pour diminuer

la viabilité cellulaire de 50% ($IC_{50}=0,20\mu M$). **5n** est dès lors 10 fois plus sélectif pour les cellules cancéreuses que pour les cellules saines, comme cela se remarque par les valeurs d'indice de sélectivité.

2.2. Toxicité cellulaire du 5n sur cellules saines et cellules cancéreuses au cours du temps

Afin de déterminer l'effet du **5n** sur le comportement des cellules, un test de viabilité cellulaire (test MTT) a été réalisé sur les cellules saines BJ et cancéreuses A549. Plus précisément, la viabilité cellulaire initiale (temps d'incubation de 0 heure) ainsi que la viabilité cellulaire après 72 heures d'incubation ont été déterminées pour différentes concentrations en **5n**.

La **Figure 24** présente un exemple de résultats de viabilité des cellules A549 (viabilité proportionnelle au nombre de cellules) à 0 heure (viabilité fixée à 1) et après 72 heures d'incubation, et ce, pour différentes concentrations en **5n**. On remarque qu'en absence de **5n** (situation contrôle), la viabilité cellulaire augmente après 72 heures d'incubation à 37°C ; ceci correspond à une croissance cellulaire normale fixée à 100% de croissance. En présence de **5n**, trois cas de figures peuvent être observés :

- La viabilité cellulaire après 72 heures d'incubation est **supérieure à 1**. Le nombre de cellules a augmenté après incubation, indiquant qu'il y a eu croissance cellulaire. En comparant la viabilité cellulaire à celle du contrôle, un pourcentage de croissance peut être déterminé. Un pourcentage de croissance de 100% indique une **inefficacité** du composé sur la prolifération cellulaire, alors qu'un pourcentage de croissance inférieur à 100% indique une **efficacité partielle** du composé sur la prolifération cellulaire.
- La viabilité cellulaire après 72 heures est **égale à 1**. Les cellules survivent mais aucune prolifération n'est observée durant les trois jours d'incubation des cellules en présence du composé. Le pourcentage de croissance cellulaire est de 0% et le composé induit un **effet antiprolifératif**.
- La viabilité cellulaire après 72 heures est **inférieure à 1**. Le nombre de cellules après 72 heures d'incubation en présence de **5n** est inférieur au nombre de cellules initial. Ceci indique que le composé induit la mort cellulaire et est défini comme **cytotoxique** pour la cellule. Le

pourcentage de croissance calculé est défini de 0% à -100%. Cette dernière valeur correspondant à 100% de mort cellulaire.

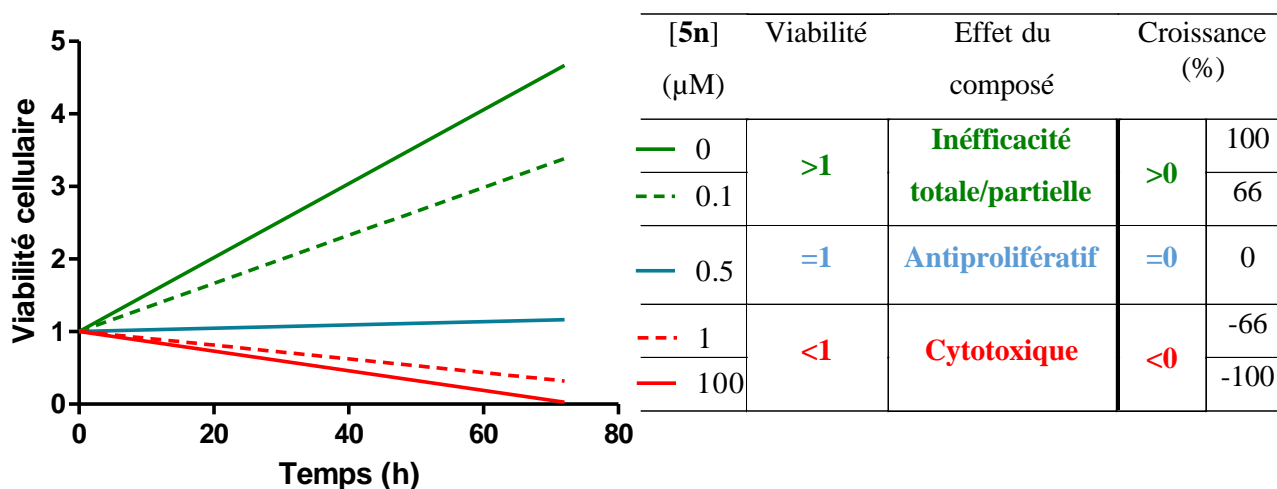


Figure 24: Schéma représentant les différents cas de figure lors de l'incubation d'un composé, à différentes concentrations, avec des cellules, pendant 72 heures. (Vert) les cellules ont continué à croître en présence du composé ; (Bleu) les cellules ont arrêté de croître durant l'incubation ; (Rouge) le composé a induit une mort cellulaire.

La **Figure 25** présente le pourcentage de croissance cellulaire (valeurs positives) et de mort cellulaire (valeurs négatives) observé pour différentes concentrations en **5n**. Plusieurs comportements peuvent être mis en évidence :

1. **Concentrations non efficaces** : aux concentrations les plus faibles (0,01 µM – 0,1 µM), on observe une croissance de 100%, identique à la croissance cellulaire en l'absence de composé (groupe contrôle). Dès lors, à ces faibles concentrations, le composé n'est pas assez puissant pour induire un effet antiprolifératif, tant sur les cellules saines que sur les cellules cancéreuses.
2. **Concentration antiproliférative** : à la concentration de 0,5 µM on observe un pourcentage de croissance cellulaire quasi nul sur les deux lignées de cellules BJ et A549, indiquant que le composé induit un arrêt de la prolifération.
3. **Cytotoxicité sélective** : à partir d'une concentration de 1 µM à 10 µM, on observe un effet cytotoxique du composé. Cependant l'induction de la mort cellulaire est moins importante sur les cellules saines que sur les cellules cancéreuses.

4. **Cytotoxicité** : aux concentrations les plus importantes (>50 μM) le composé induit 100% de mort cellulaire, et ce, pour les deux types de cellules étudiés.

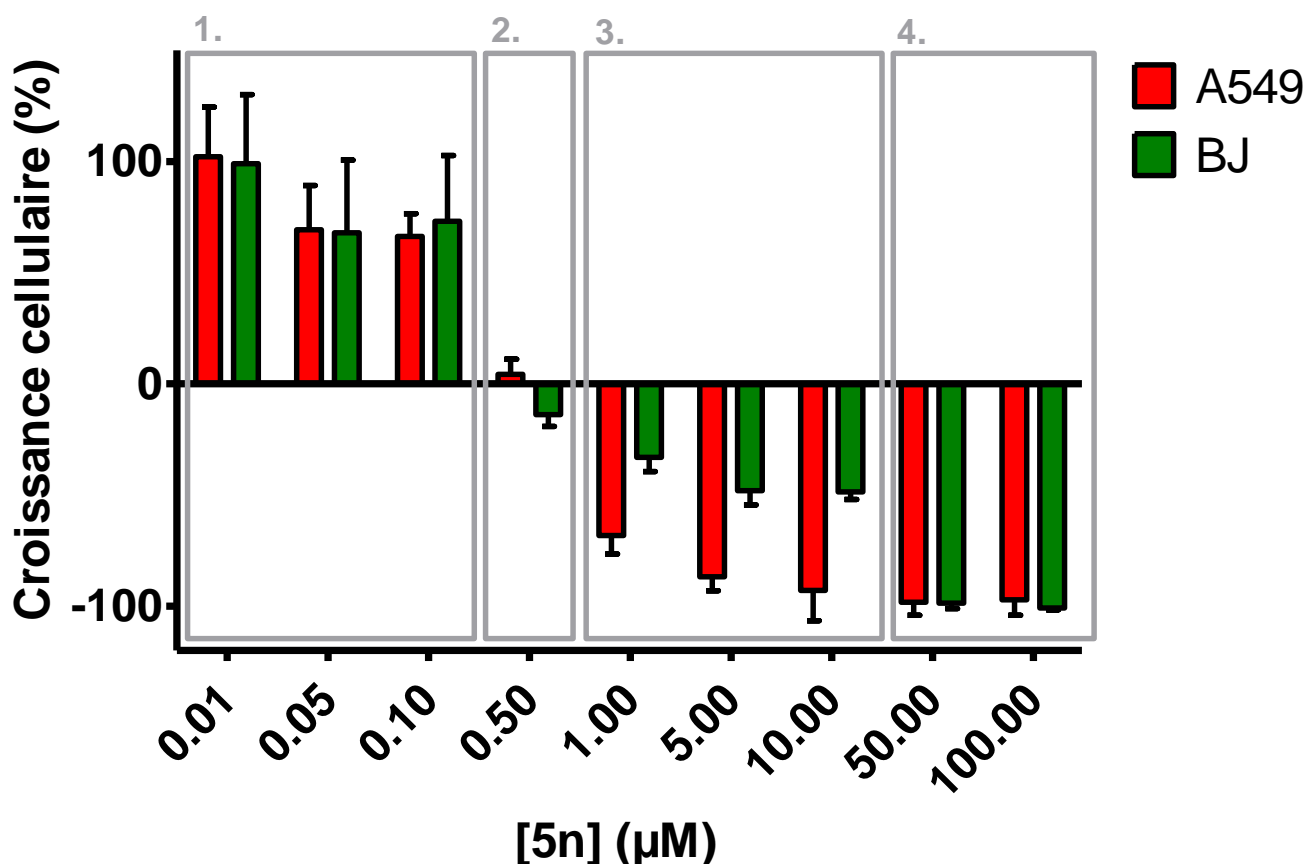


Figure 25: Evaluation de la croissance des cellules cancéreuses (A549) et des cellules saines (BJ) après 72 heures d'incubation en présence de **5n**, comparée à la viabilité cellulaire des cellules au temps 0 (définie comme une croissance cellulaire de 0%). Les valeurs positives reflètent la croissance cellulaire tandis que les valeurs négatives reflètent la mort cellulaire.

A partir de ces observations, on note que seules des concentrations comprises entre 1 μM et 10 μM induisent un effet cytotoxique différencié sur les cellules étudiées. Dès lors, la différence d' IC_{50} observée entre cellules saines et cancéreuses est relative à cet effet.

2.3. Stabilité plasmatique de 5n

La détermination de la stabilité plasmatique d'un composé est importante et préliminaire à l'étude *in vivo*. En effet, une molécule (autre qu'une prodrogue) qui se dégrade dans le plasma sera moins active

in vivo. La stabilité plasmatique de **5n** a été évaluée dans du plasma humain reconstitué. Après incubation, le **5n** présent dans le plasma a été dosé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Les résultats présentés dans le **Tableau 15** indiquent que **5n** est stable pendant au moins 8 heures dans le plasma humain. Cette stabilité s'explique notamment par l'absence de fonction hydrolysable au sein de la molécule **5n**.

Tableau 15: Pourcentage en **5n** après 0-0,25-0,50-1-2-4-8 heures d'incubation à 37°C dans du plasma humain reconstitué.

Temps (heures)	Pourcentage de 5n dans le plasma humain (37°C, 500 rpm) \pm SD ^a (%)
0	100 \pm 2
0,25	103 \pm 5
0,50	98 \pm 6
1	102 \pm 3
2	100 \pm 2
4	104 \pm 3
8	105 \pm 5

^aSD : Déviation standard.

3. ÉTUDE *IN VIVO*

3.1. Évaluation de la dose maximale tolérée

La dose maximale tolérée (DMT) représente la dose maximale qui peut être administrée sans observer d'effets indésirables. La DMT a été évaluée après administration intrapéritonéale (IP) unique de **5n** (1 et 5 mg.kg⁻¹) à un groupe de six souris femelles de six semaines. Chaque animal a été observé (masse, comportement) quotidiennement au cours des 28 jours suivant l'administration. A la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés et les organes ont été prélevés et conservés afin de réaliser une analyse histopathologique[120]. Il est à noter que la préparation de **5n** dans les deux types d'excipients choisis (99,9% NaCl 0,9% m/v / 0,01% Tween-80 ou 90% NaCl 0,9% m/v / 10% DMSO) donne lieu à une suspension. Une administration par voie intraveineuse (IV) est donc proscrite afin d'éviter tout risque

d'embolie pulmonaire, dès lors une administration de **5n** (excipient composé de 99,9% NaCl 0,9% m/v et de 0,01% Tween-80) par voie IP a été réalisée.

La **Figure 26** décrit le taux de survie aux deux doses étudiées. On remarque que l'administration de 5 mg.kg⁻¹ par voie intrapéritonéale correspond à un taux de survie de 67% en fin d'expérience, alors qu'il est de 100% pour une dose de 1 mg.kg⁻¹ administrée par voie intrapéritonéale.

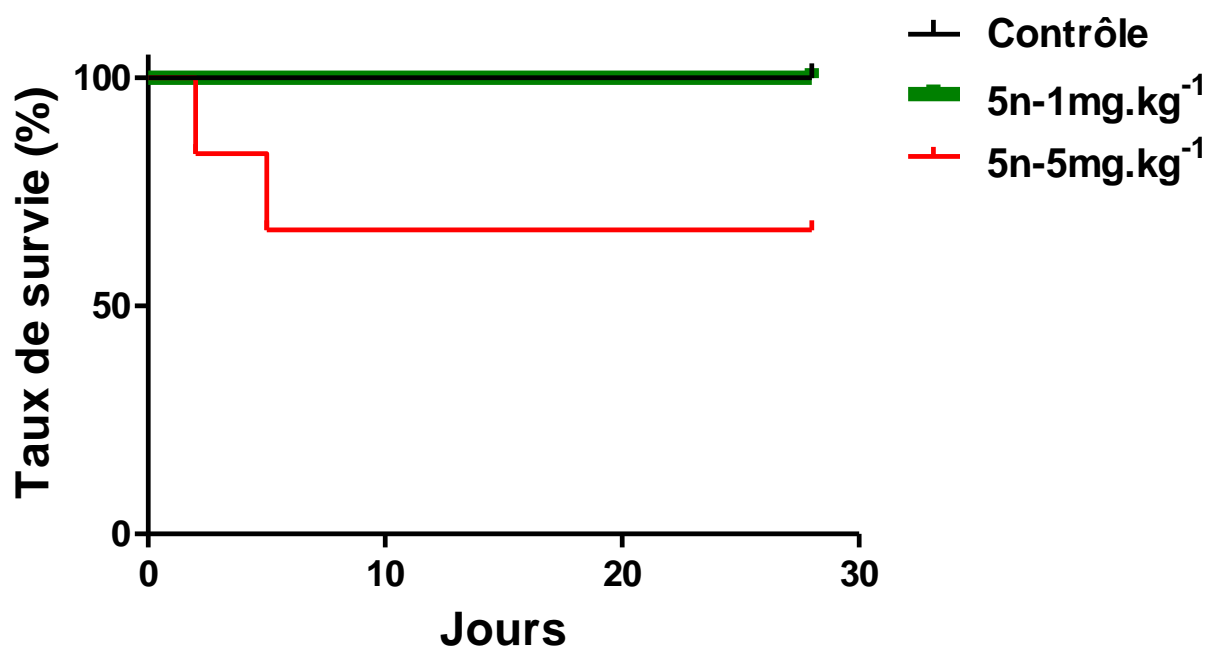
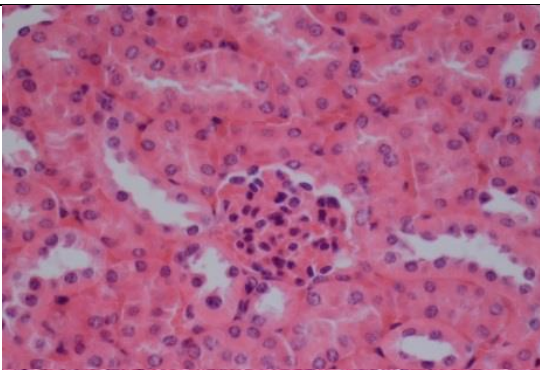
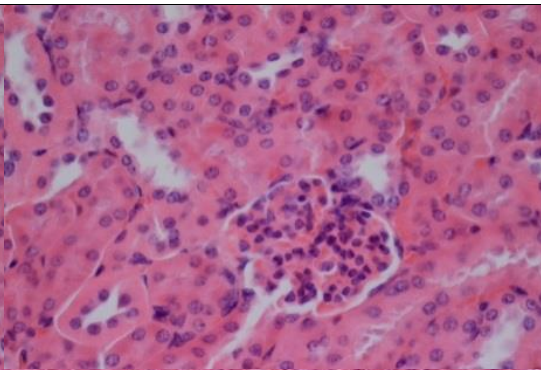
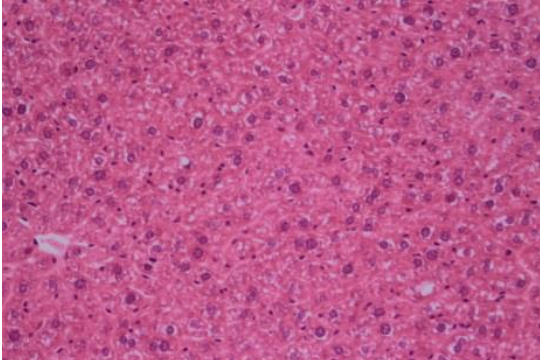
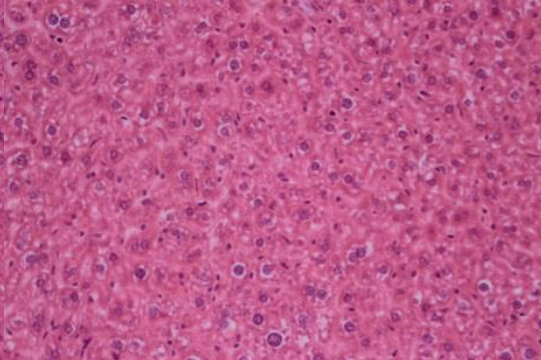
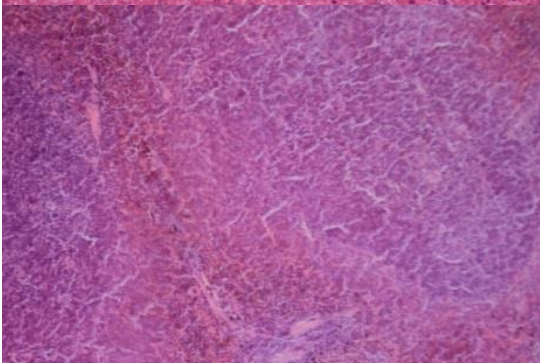
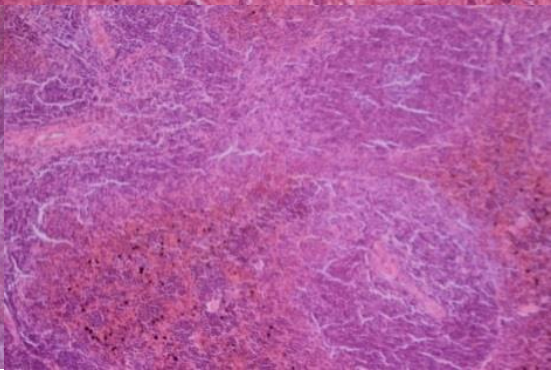


Figure 26: Taux de survie (%) obtenu sur 28 jours après administration intrapéritonéale unique de l'excipient (99,9% NaCl 0,9% m/v et de 0,01% Tween-80) (Contrôle) ou de composé **5n** à une dose de 1 mg.kg⁻¹ ou 5 mg.kg⁻¹. Chaque groupe comprend six animaux.

D'un point de vue comportemental, l'injection de la dose à 5 mg.kg⁻¹ induit un comportement amorphe après l'administration, et jusque 24 à 48 heures avant de retrouver un comportement normal. Ce résultat suggère un effet du composé au niveau du système nerveux central. Par contre, aucune modification du comportement n'a été observée après l'administration de la dose de 1 mg.kg⁻¹. Au terme de l'expérience, les organes des animaux des deux groupes étudiés ne présentaient aucun dommage d'un point de vue macroscopique. De plus, les coupes histologiques des reins, du foie et de la rate ne présentaient également aucune anomalie (**Tableau 16**).

Suite à l'ensemble des observations, la dose maximale tolérée a été déterminée comme correspondant à une dose de 1 mg.kg⁻¹ administrée par voie IP.

Tableau 16: Comparaison des coupes histologiques des reins, foies et rates d'animaux faisant partie du groupe traité par l'excipient (Contrôle) (administration IP) (99,9% NaCl 0,9% m/v et de 0,01% Tween-80) et traité par le composé **5n** pour une dose de 5 mg.kg⁻¹ (administration IP). Les résultats ne montrent aucune anomalie au niveau des coupes histologiques des organes des animaux traités par le **5n** par rapport aux coupes histologiques des organes des animaux traités par l'excipient (Contrôle). Ces coupes ont été réalisées par Lutfiye Alpan, Namedic, UNamur.

Organe	Contrôle	5n (5mg.kg ⁻¹)
Reins		
Foie		
Rate		

3.2. Évaluation de l'effet anticancéreux *in vivo*

L'effet anticancéreux de **5n** a été évalué sur un modèle murin présentant des métastases pulmonaires obtenues par injection de cellules de mélanome murin (B16F10). Il est à noter que le composé **5n** possède une activité sur les cellules B16F10 du même ordre de grandeur (IC₅₀=0,3μM) que l'activité obtenue sur les cellules cancéreuses humaines testées (IC₅₀=0,3μM)[121]. Cinq jours après injection

des cellules cancéreuses dans la veine caudale, les souris (treize animaux par groupe) ont été traitées trois fois par semaine, par voie orale, par le témozolomide (80 mg.kg^{-1} , agent anticancéreux de référence), ou traitées une fois par semaine, par voie intrapéritonéale, par le **5n** (1 mg.kg^{-1}). Un groupe contrôle recevant uniquement l'excipient (99,9% NaCl 0,9% m/v et 0,01% Tween-80) a également été constitué.

Le témozolomide a été choisi comme composé de référence. En effet, ce composé possède une activité anticancéreuse sur le modèle murin choisi, en augmentant significativement le temps de survie des animaux[122,123].

Afin de définir l'effet de **5n** sur ce modèle pseudométastatique agressif, le temps de survie obtenu pour le groupe **5n** est comparé au temps de survie du groupe contrôle et du groupe traité par le témozolomide (Figure 27).

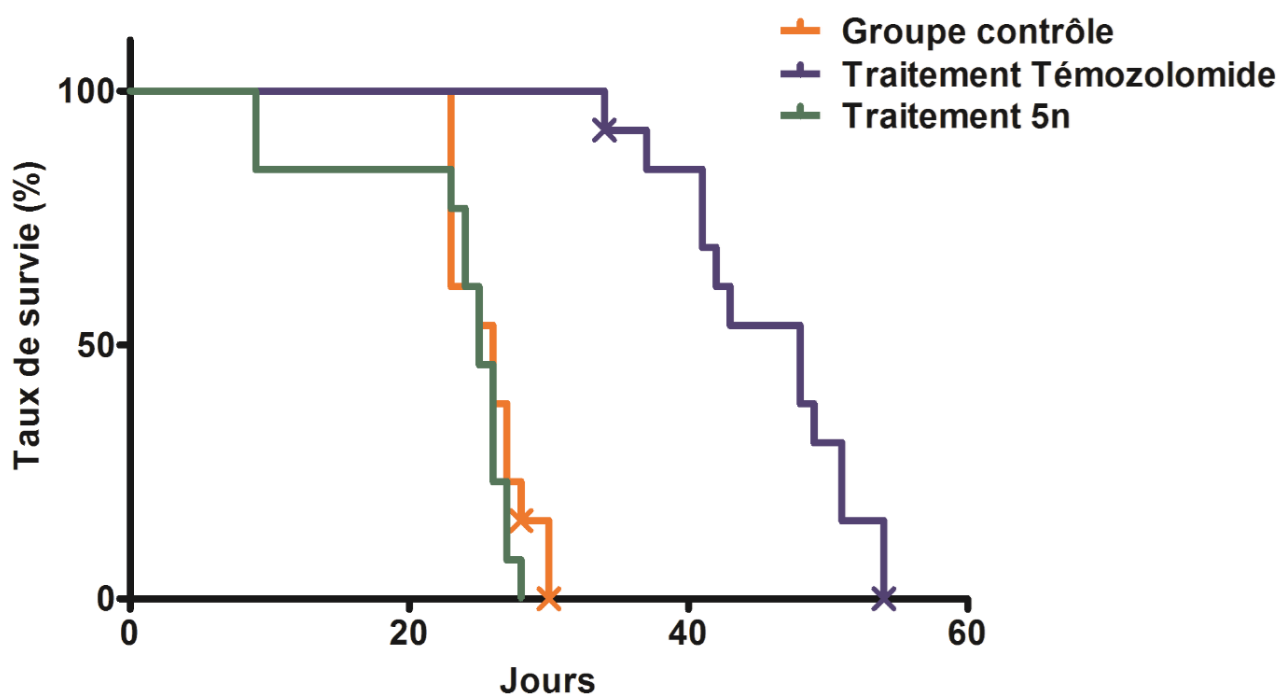


Figure 27: Détermination du taux de survie pour le groupe contrôle traité par administration intrapéritonéale de l'excipient trois fois par semaine pendant une semaine (99,9% NaCl 0,9% m/v et 0,01% Tween-80) (treize animaux), le groupe traité par une administration orale de témozolomide (80 mg.kg^{-1}) trois fois par semaine pendant trois semaines (treize animaux) et le groupe traité par administration intrapéritonéale de **5n** (1 mg.kg^{-1}) une fois par semaine pendant trois semaines (treize animaux), cinq jours après injection de 250 000 cellules B16F10 par souris. Les analyses statistiques (valeur de p) ont été déterminées par un test de Log-Rank. Non significatif ($p > 0,05$), très significatif ($p < 0,0001$). La présence de croix désigne l'euthanasie d'un animal.

Les résultats du taux de survie au cours du temps pour les différents groupes étudiés sont présentés à la **Figure 27**. On remarque que le traitement par le témozolomide permet d'augmenter de manière significative ($p < 0,0001$) le temps de survie par rapport au groupe contrôle, ce qui permet de valider l'expérience. Par contre, en ce qui concerne le groupe traité par le **5n**, on ne remarque pas de différence significative par rapport au groupe contrôle ($p > 0.05$), permettant de conclure que le composé **5n** n'est pas actif sur le modèle étudié. A partir de cette conclusion, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- La dose administrée est plus faible que la dose efficace. Il n'y a donc pas d'effet anticancéreux à la dose étudiée.
- Le composé **5n** possède des propriétés pharmacocinétiques qui empêchent d'atteindre la dose efficace. Notamment, une mauvaise perméabilité du composé peut induire une diffusion trop lente de celui-ci vers la circulation sanguine, empêchant d'atteindre la dose efficace dans le sang. Une métabolisation et/ou une élimination trop rapide du composé empêcherait également d'atteindre la concentration efficace, ne permettant pas d'observer un effet anticancéreux.
- Le composé n'est pas actif sur le modèle choisi. En effet, le modèle utilisé induit l'apparition de métastases pulmonaires et est très agressif. Les métastases présentent des modifications génétiques comparées aux tumeurs primaires, induisant des phénotypes différents[124]. Il serait dès lors intéressant d'étudier l'effet de **5n** sur la croissance de tumeurs au sein d'un modèle de tumeur sous-cutanée. Certains résultats présents dans la littérature indiquent notamment que les dérivés trisubstitués de l'harmine induisent une diminution de la croissance cellulaire jusqu'à 53% sur des modèles de tumeurs sous-cutanées de Sarcome 180[63,64].

3.3. Évaluation de la pharmacocinétique du composé 5n

L'une des hypothèses émise et expliquant le manque d'effet anticancéreux observé sur le modèle pseudométastatique étant une mauvaise perméabilité de **5n**, une étude pharmacocinétique de ce composé a été réalisée. Après administration par voie IP du composé **5n** (5 mg.kg^{-1}), les animaux ont été sacrifiés entre 0 et 24 heures et le sang a été prélevé. La concentration en composé **5n** ayant atteint la circulation sanguine a ensuite été déterminée *via* un dosage plasmatique par fluorescence.

Les résultats ont mis en évidence l'absence du composé **5n** dans la circulation sanguine pour une concentration supérieure à 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (limite de détection), et ce, jusqu'à 24 heures après administration IP. Ces résultats renforcent l'hypothèse émise d'une faible résorption du composé **5n** après administration intrapéritonéale, empêchant d'atteindre la dose efficace au sein de la circulation sanguine.

4. CONCLUSIONS

In vitro, le composé **5n** présente une activité antiproliférative submicromolaire sur diverses lignées de cellules cancéreuses et une bonne solubilité cinétique ($>189 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Afin d'étudier ce composé, des études *in silico*, *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées.

Dans un premier temps, l'étude *in silico* suggère un caractère très pénétrant de **5n** au niveau de la barrière hématoencéphalique. Cette prédiction, devant être confirmée expérimentalement, renforce l'intérêt porté à l'étude de l'activité antiproliférative de **5n** sur différentes lignées de tumeurs cérébrales.

Dans un second temps, une étude *in vitro* a été réalisée. Celle-ci met en évidence la sensibilité plus importante des cellules cancéreuses du poumon (A549) à l'action antiproliférative de **5n**, par rapport aux cellules saines endothéliales (HUVEC) ou de fibroblastes (BJ). Ceci s'explique notamment par une induction plus importante de la mort cellulaire sur les cellules cancéreuses A549. Une étude de stabilité de **5n** a également été réalisée, montrant que celui-ci ne se dégradait pas dans le plasma humain, et ce pendant au moins 8 heures.

Dans un troisième temps, une première étude *in vivo* a été réalisée. Etant donné que la préparation de **5n** dans différents excipients menait à une suspension, une administration intrapéritonéale a été réalisée. La dose maximale tolérée a été déterminée à 1 mg.kg^{-1} . Dès lors, cette dose a été utilisée afin d'évaluer l'action anticancéreuse *in vivo* de **5n**. Cette expérience a été réalisée sur un modèle murin de mélanome présentant des métastases pulmonaires. Le temps de survie des groupes traité par le témozolomide (agent anticancéreux de référence), traité par le **5n** et non traité (groupe contrôle) montre que le composé **5n** n'a pas d'effet anticancéreux dans le modèle utilisé. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat dont une perméabilité trop lente du composé après injection intrapéritonéale, hypothèse renforcée par l'étude pharmacocinétique de **5n**, ou une inactivité de **5n** sur le modèle pseudométastatique. Afin de définir le pouvoir anticancéreux de **5n**, il serait, dès lors, intéressant d'étudier l'effet de **5n** sur la croissance tumorale *via* un modèle de tumeur sous-cutanée et ce, après une

administration IV de **5n** afin que l'entière de la dose administrée soit présente dans la circulation sanguine.

Partie 3 :

Etude de la formulation du composé 5n

Cette troisième partie est consacrée à l'étude de la formulation de **5n**. En effet, l'une des hypothèses émises afin d'expliquer l'inactivité du composé sur le modèle murin utilisé, et renforcée par l'étude pharmacocinétique de **5n**, est la mauvaise résorption du composé après administration par voie IP, induisant une faible biodisponibilité. Dès lors, le but est d'administrer le composé par voie IV, permettant ainsi une biodisponibilité de 100%. Ce type d'administration n'étant possible que pour une solution, l'étude de la complexation de **5n** avec les cyclodextrines a été réalisée afin d'augmenter la solubilité de la molécule d'intérêt dans l'excipient.

1. LES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines (CDs) sont des composés cycliques, naturels, composés de 6, 7 ou 8 unités de glucose et présentant la forme d'un cône tronqué (**Figure 28**). De par leur conformation, les CDs ont une surface extérieure de caractère polaire et une cavité intérieure de caractère apolaire. Les CDs peuvent interagir avec une large gamme de composés apolaires ce qui permet l'inclusion partielle ou totale de ces molécules au sein de la cavité des CDs. Cette inclusion induira une modification de la solubilité, de la biodisponibilité ou encore de la stabilité de la molécule invitée. De par ces caractéristiques, les cyclodextrines sont des molécules largement étudiée dans le domaine pharmaceutique[125,126].

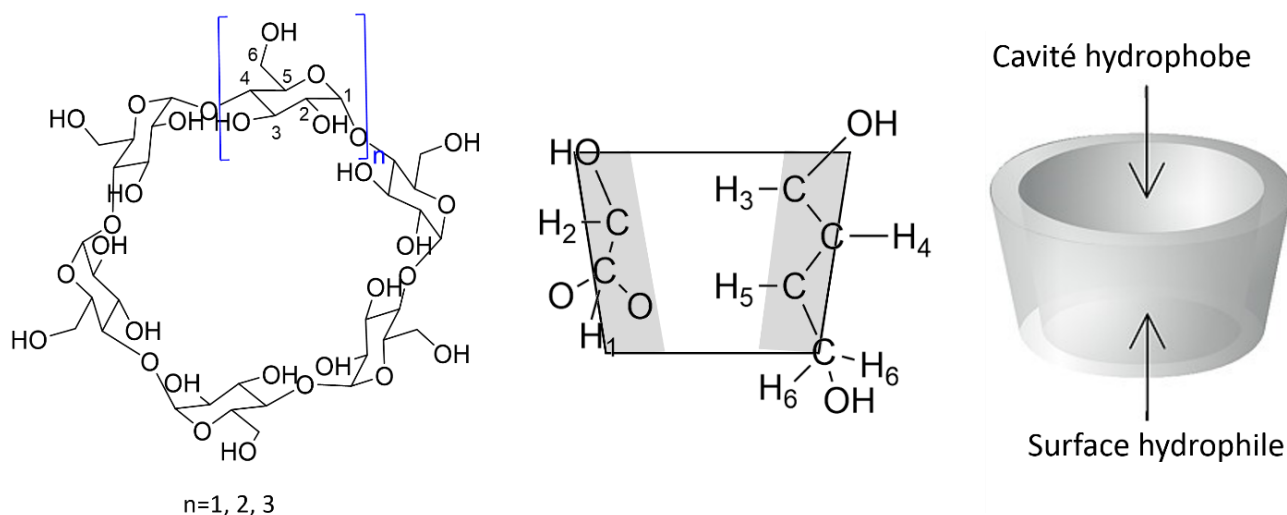


Figure 28: Schéma représentant la structure et la forme des cyclodextrines.

L'harmine, le norharmane et l'harmane sont des β -carboline qui sont décrites comme pouvant être incluses dans la cavité apolaire des β CD (CD naturelle composée de 7 sous-unités de glucose)[127–129]. Les modèles représentant les interactions de stœchiométrie 1:1 montrent une inclusion de la partie indolique de la β -carboline au sein de la cavité de la cyclodextrine (**Figure 29**).

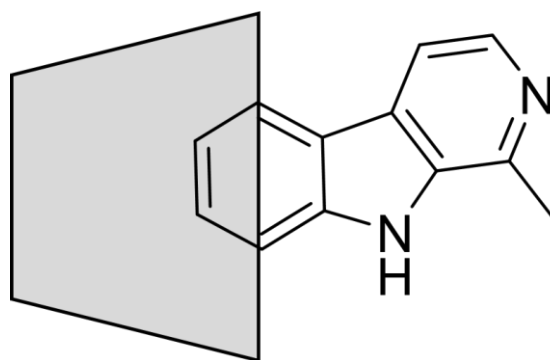


Figure 29: Modèle proposé représentant l'interaction de la partie indolique du noyau β -carboline avec la cavité de la cyclodextrine[128].

Etant donné l'augmentation de la solubilité des composés hydrophobes en complexation avec les CDs, et puisque certaines β -carboline interagissent avec ces molécules hôtes, l'utilisation de ces composés cycliques a été étudiée dans le but d'améliorer la solubilité de **5n**. Plus précisément, la complexation de **5n** avec les trois CDs naturelles (α -, β - et γ -) a été étudiée. De plus, étant donné la faible solubilité de la β CD, la complexation de **5n** avec la CD modifiée par des groupements 2-hydroxypropyle (2HP- β CD)

a également été évaluée. Tout comme la β CD, la 2HP- β CD est constituée de 7 sous-unités de glucose. Par contre, elle est caractérisée par une solubilité intrinsèque dans l’eau beaucoup plus importante que la β CD. De plus, contrairement à la β CD, la 2HP- β CD entre dans la composition de certains médicaments administrés par voie IV. Le **Tableau 17** présente la solubilité intrinsèque dans l’eau des différentes cyclodextrines étudiées dans ce travail. De plus, un exemple de médicament administré par voie IV et incluant ces cyclodextrines est également présenté, confirmant ainsi leur utilisation dans le cadre de ce travail.

Tableau 17: Solubilité dans l’eau et exemple de médicament administré par voie IV et incluant une cyclodextrine.

Nom	Nombre de sous unités de glucose	Solubilité dans l’eau (25°C) (mM)[130]	Exemple de médicament administré par voie IV
α CD	6	150	Alprostadil (Caverject Dual®) (Pfizer)
β CD	7	16	/
2HP- β CD	7	430	Mitomycine (MitoExtra®) (Novartis)
γ CD	8	180	Tc-99 Teboroxime (Cardiotec®) (Squibb Diagnostics)

2. ETUDE DE SOLUBILITÉ

2.1. Criblage des cyclodextrines

Afin de déterminer la capacité d’interaction entre les CDs et le **5n**, la solubilité thermodynamique de **5n** a été déterminée en présence et en absence de différentes CDs (5 mM), constituées d’un nombre variable de sous-unités de glucose (n). Les résultats présentés à la **Figure 30** montrent, d’une part, que **5n** présente une solubilité thermodynamique intrinsèque de 1,1 mg.mL⁻¹ et que, d’autre part, cette solubilité est augmentée en présence des différentes CDs étudiées.

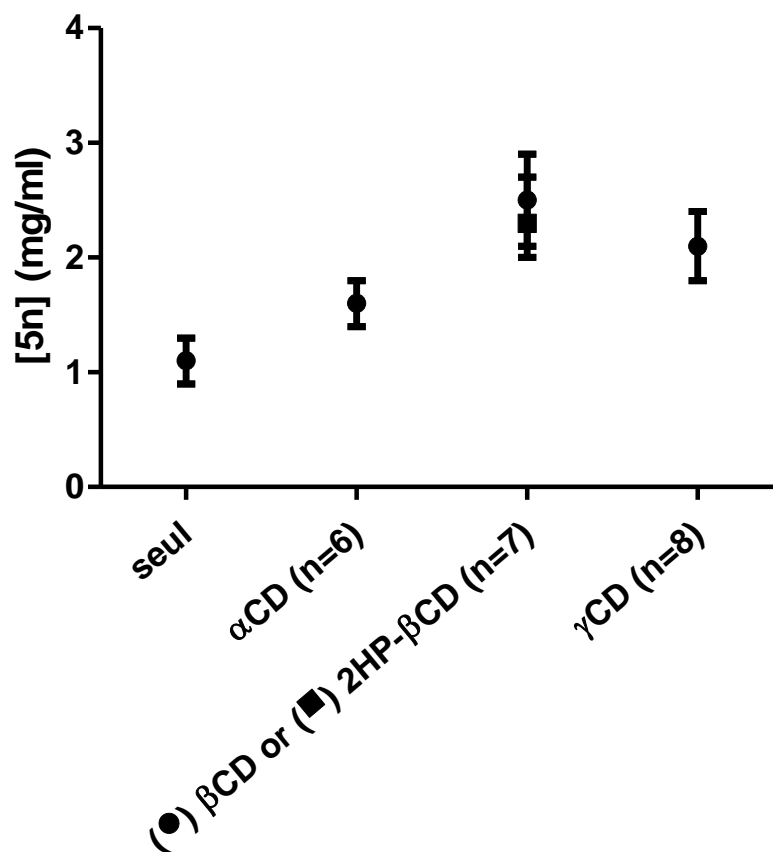


Figure 30: Solubilité thermodynamique mesurée de **5n** en absence et en présence de cyclodextrines, au pH physiologique, à 25°C.

Plus précisément, un nombre optimal de 7 sous-unités de glucose permet de doubler la solubilité de **5n**. Ces résultats reflètent une meilleure interaction entre **5n** et la βCD ou la 2HP-βCD, contrairement à la plus petite (αCD) ou la plus large (γCD) CD. De plus, la même valeur de solubilité de **5n** obtenue en présence de βCD (2,5 mg.mL⁻¹) et de 2HP-βCD (2,3 mg.mL⁻¹) suggère un même mécanisme d'inclusion en présence des deux CDs. Basé sur ces résultats, une étude plus approfondie de la solubilité de **5n** en présence de CD composée de 7 sous-unités de glucose a été réalisée.

2.2. Expérience de solubilité de phase

Une expérience de solubilité de phase a été réalisée afin de déterminer la concentration en **5n** soluble mesurée pour des concentrations croissantes en CD (**Figure 31**). Il est à noter que cette expérience s'est réalisée en présence de la 2HP-βCD. En effet, la faible solubilité intrinsèque (S_0) de la βCD ($S_0=16$

mM)[125] limiterait l'étude de solubilité de **5n** pour des hautes concentrations en CDs, contrairement à la 2HP- β CD qui est plus soluble ($S_0 > 430$ mM)[130].

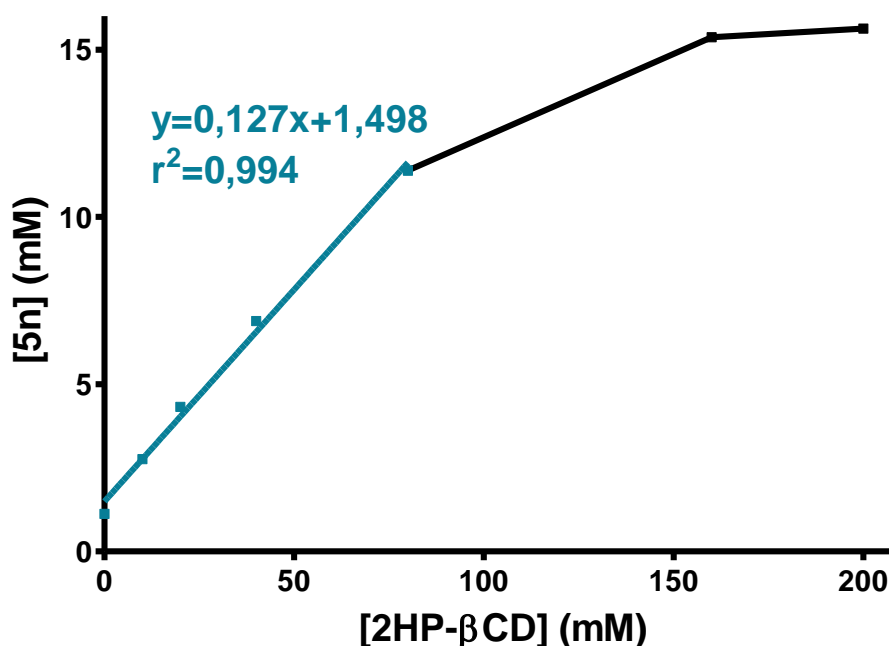


Figure 31: Diagramme de solubilité de **5n** en présence de 2HP- β CD dans un tampon phosphate (pH 7,4), à 25°C, après 72 heures d'agitation.

La **Figure 31** met en évidence l'augmentation de la solubilité de **5n** en présence de concentrations croissantes en CD. Cette augmentation de solubilité est caractérisée par un profil de type A_N [131]. Ce profil met en évidence une première augmentation linéaire de la solubilité du **5n** en présence de CD suivie d'une déviation négative par rapport à la linéarité, pour des concentrations en CDs plus importantes. Ceci peut être expliqué par une association de cyclodextrines à plus haute concentration[132]. Plus précisément, on observe une augmentation linéaire de la concentration en **5n** soluble par rapport à la concentration en CD, jusqu'à une concentration en CD de 80 mM. Pour ce type de réponse, une pente inférieure à l'unité suggère la présence d'un complexe de stœchiométrie 1:1[131]. La constante de stabilité apparente calculée du complexe correspond à 116 M^{-1} . L'efficacité de complexation peut également être calculée. Plus la valeur est importante et plus un grand nombre de cyclodextrines sont impliquées dans un complexe 1:1. Pour le complexe **5n** : 2HP- β CD, une valeur de 0,28 a été déterminée, indiquant, qu'en moyenne, une cyclodextrine sur quatre est impliquée dans la complexation[133]. Ces valeurs de constante de stabilité et d'efficacité de complexation sont généralement obtenues pour des complexes de ce type, indiquant l'inclusion de **5n** au sein de la 2HP- β CD[126,130].

3. ETUDE DE LA STœCHIOMÉTRIE DU COMPLEXE

Afin de déterminer la stœchiométrie du complexe, la méthode de variation continue (ou méthode de Job) a été utilisée.

Une première étude spectrophotométrique du **5n** en présence de la 2HP- β CD a été réalisée afin de déterminer la stœchiométrie du complexe. Cette étude a notamment permis de mettre en évidence le pouvoir fluorescent de **5n** ($\lambda_{\text{excitation}}=330\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=440\text{nm}$). Cependant, la stœchiométrie du complexe n'a pu être déterminée de par l'absence de variations d'absorbance ou de fluorescence du composé en présence de la CD.

Dès lors, la variation de déplacement chimique du proton H-3 de la CD a été déterminé par résonance magnétique nucléaire (RMN), et ce, pour différentes fractions molaires. En effet, comme ce proton se trouve au sein de la cavité de la CD, son déplacement chimique traduit la complexation avec **5n** (Figure 32).

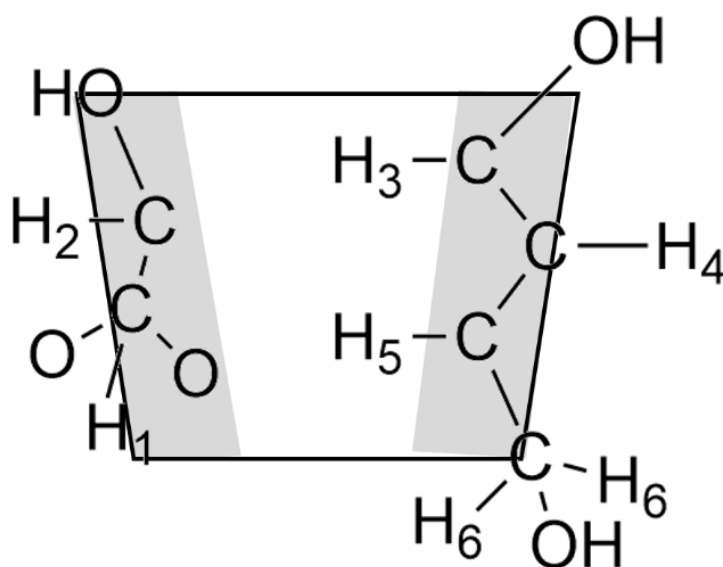


Figure 32: Schéma représentant la distribution des atomes dans la coupe d'une cyclodextrine.

Il est à noter qu'un trop grand nombre d'isomères de 2HP- β CD ne permet d'assigner les protons de cette CD[134,135]. Dès lors, étant donné que le mécanisme d'interaction semble similaire entre la β CD et la 2HP- β CD, l'expérience s'est réalisée en présence de β CD. La Figure 33 présente la superposition des déplacements chimiques du proton H-3 en fonction de la fraction molaire en β CD. On remarque d'une part que les déplacements chimiques correspondant aux protons présents au sein de la CD (H-3 et H-5) sont modifiés lors de l'ajout de **5n**, contrairement au déplacement chimique du proton H-6,

présent à l'extérieur de la cavité. On remarque également que pour les fractions molaires en β CD ($r_{\beta\text{CD}}$) de 0,5 et 0,6 ; il y a une superposition des protons H-3 et H-6 ne permettant pas de définir le déplacement chimique du proton H-3, pour ces deux expériences. Dès lors, une régression non linéaire a été réalisée afin de déterminer la stœchiométrie du complexe (**Figure 34**).

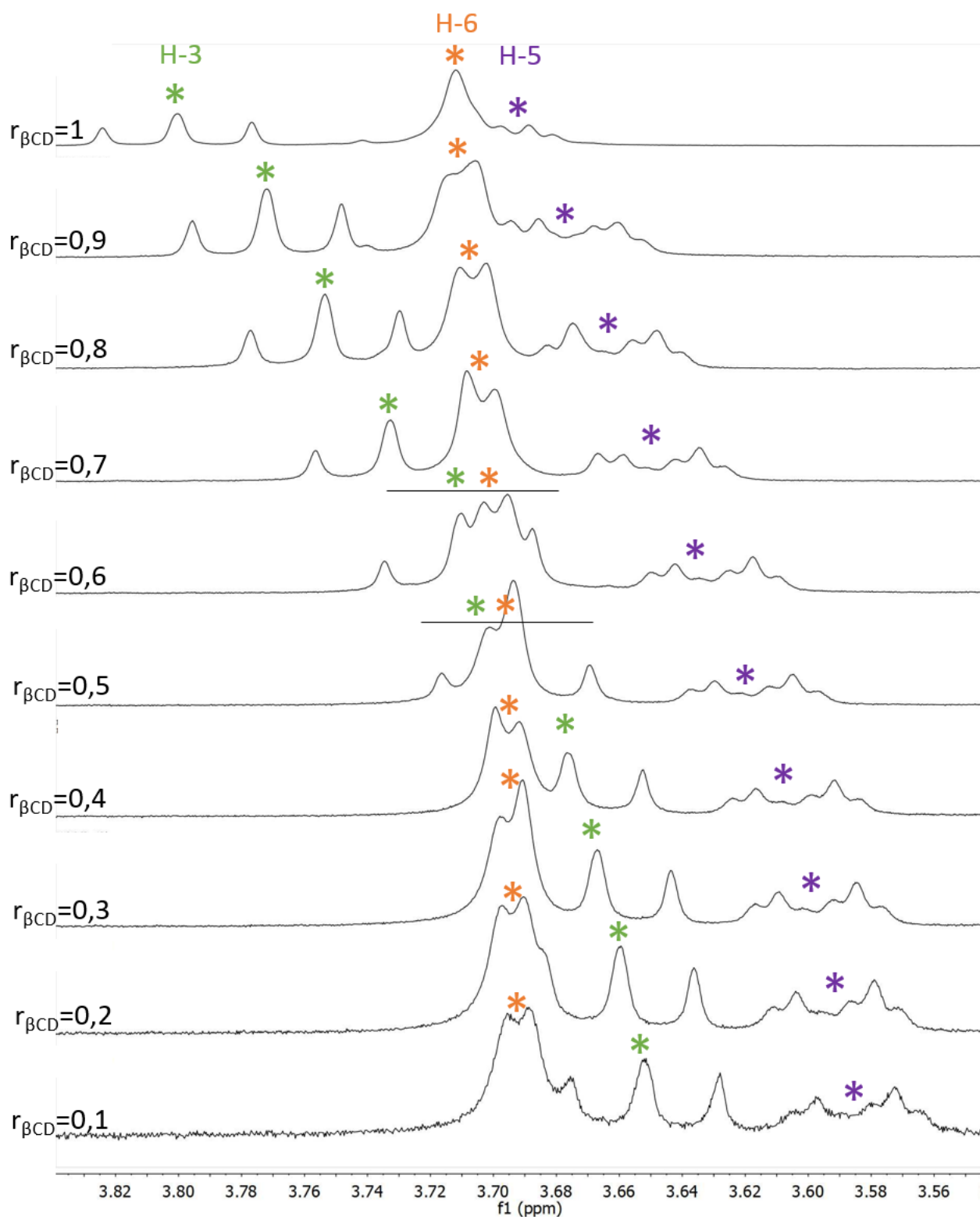


Figure 33: Superposition des déplacements chimiques des protons de la β CD (H-3, H-5 et H-6) dans la D_2O en fonction de la fraction molaire en β CD ($r_{\beta\text{CD}}$).

Les résultats obtenus présentés à la **Figure 34** indiquent une valeur maximale pour une fraction molaire en β CD de 0,53. Cette valeur confirme la stœchiométrie 1:1 du complexe, comme cela a été suggéré par l'expérience de solubilité de phase.

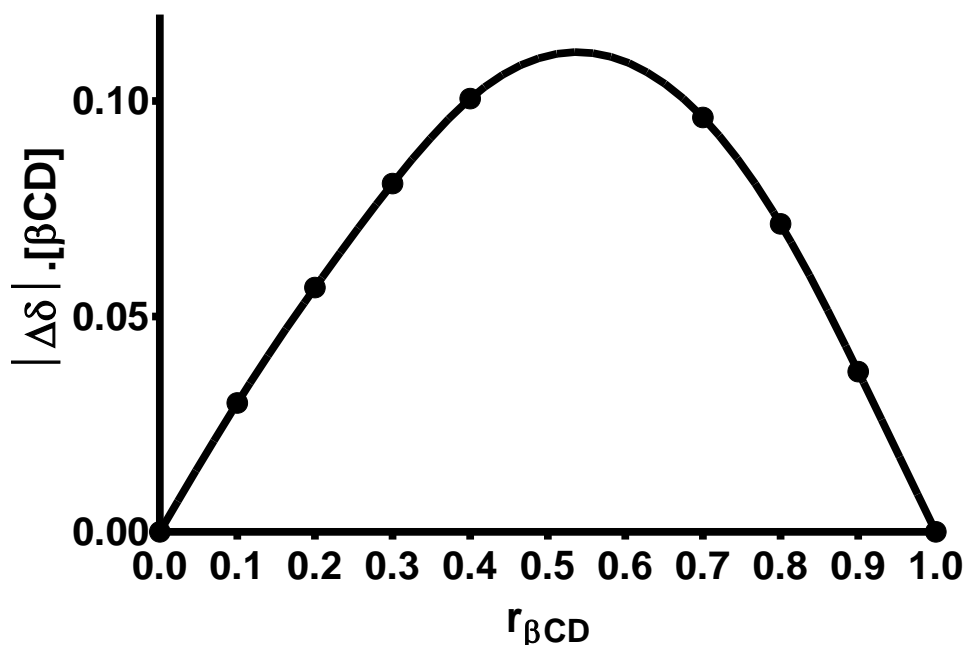


Figure 34: Évaluation de la stœchiométrie du complexe **5n** : β CD, par la méthode des variations continues (méthode de Job), déterminée en suivant, par ^1H -RMN, le déplacement chimique du proton H-3 dans la D_2O .

4. ETUDE DE LA GÉOMÉTRIE DU COMPLEXE **5n** : β CD

4.1. Etude par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (^1H -RMN)

Afin d'avoir des informations sur la géométrie du complexe, les déplacements chimiques des protons de la CD et de **5n** seuls ont été comparés aux déplacements chimiques des mêmes protons lors de la formation du complexe. La **Figure 35** présente les déplacements chimiques des protons constituant la CD, en absence et en présence de **5n** et pour une stœchiométrie 1:1. Plusieurs observations peuvent être mises en évidence. Le proton H-3 présent au sein de la cavité de la CD est blindé en présence de **5n**. Ceci pourrait être dû à l'anisotropie magnétique due à la délocalisation des électrons π du squelette β -carboline confirmant l'inclusion de **5n** au sein de la CD[134]. On remarque également une modification

du déplacement chimique du proton H-5 se trouvant également au sein de la cavité, lors de l'ajout de **5n**, comme cela a été clairement remarqué lors de l'expérience utilisant la méthode de Job (**Figure 33**). Cependant, l'important déplacement chimique observé pour le proton H-3, en comparaison avec celui du proton H-5, suggère une inclusion de **5n** par le côté le plus large de la cavité[134]. On remarque également que les protons distribués sur la surface extérieure de la cyclodextrine (H-1, H-2, H-4 et H-6) ne sont pas affectés par la présence de **5n** ; écartant la possibilité d'adsorption de **5n** sur la surface de la CD. Enfin, l'absence de nouveaux pics dans le spectre du complexe **5n** : β CD souligne un échange rapide entre la CD et **5n** à l'échelle de temps de la RMN.

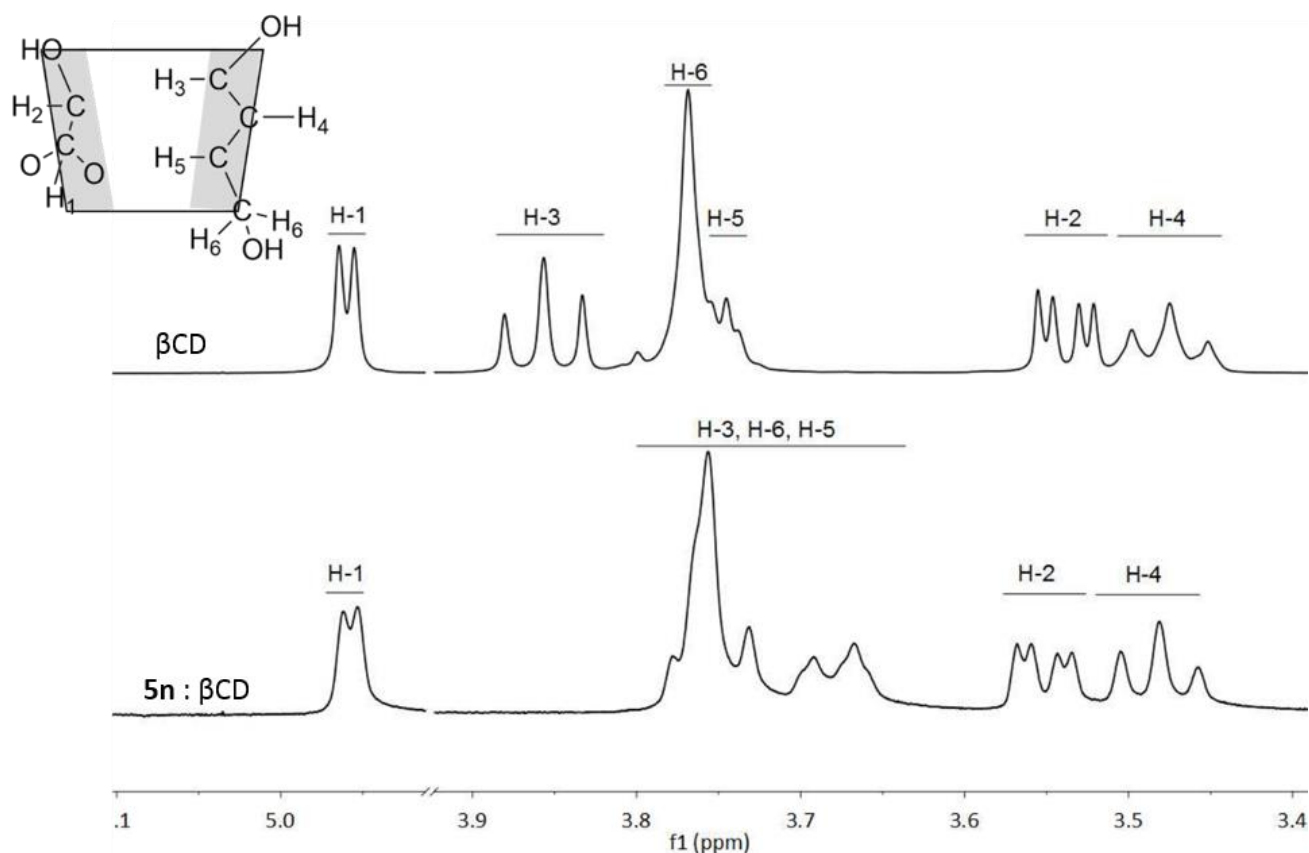


Figure 35: Comparaison des spectres ^1H -RMN de (haut) β CD (bas) **5n** : β CD en stœchiométrie 1:1.

En ce qui concerne les protons présents sur la molécule **5n**, la **Figure 36** montre une modification du déplacement chimique plus importante pour les protons aromatiques que pour les protons présents sur les substituants de la molécule. Plus précisément, un déblindage de ces protons aromatiques pourrait être expliqué par la présence d'atomes d'oxygène provenant de la CD[134]. Ces résultats suggèrent une interaction plus importante entre les protons de la cyclodextrine et ceux des protons aromatiques de **5n** plutôt qu'avec les protons portés par les substituants de **5n**.

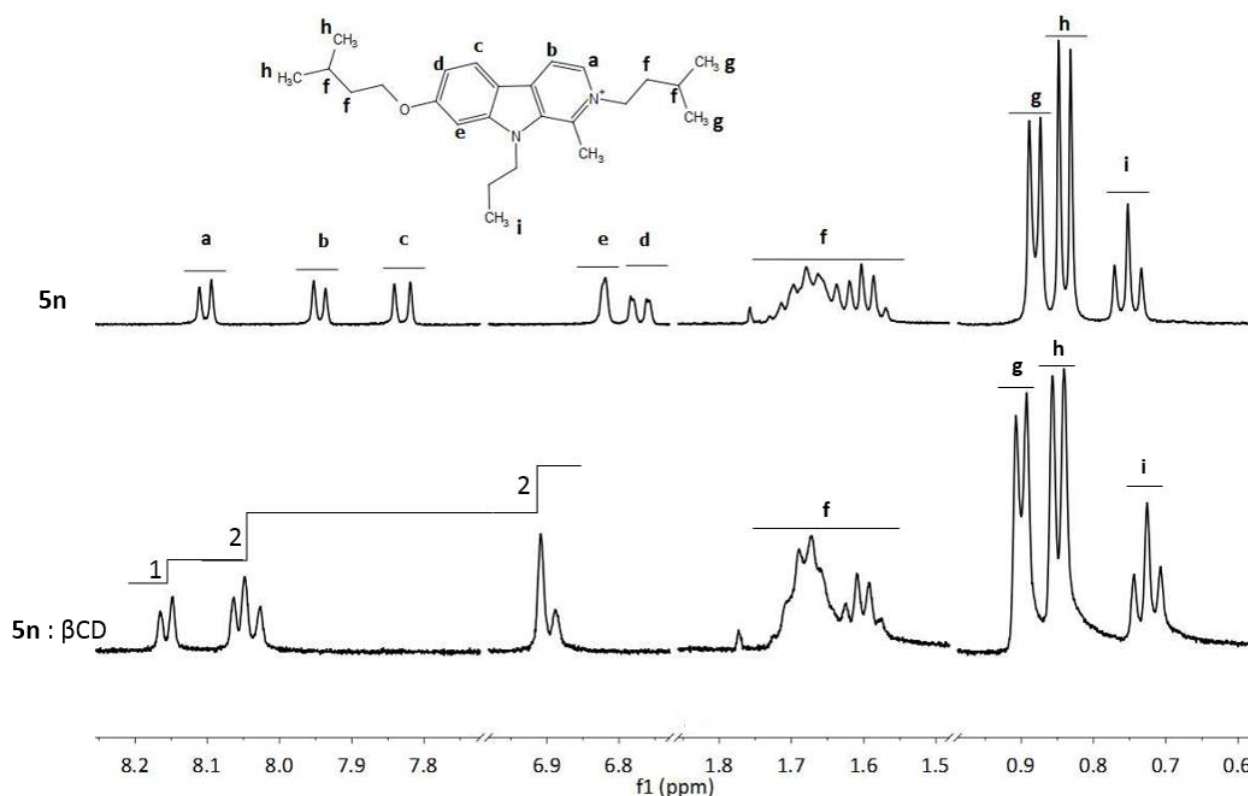


Figure 36: Comparaison des spectres ^1H -RMN de (haut) **5n** (bas) **5n**: β CD en stœchiométrie 1:1.

4.2. Etude d'optimisation de géométrie du complexe **5n** : β CD

La géométrie du complexe **5n** : β CD a été évaluée suivant les résultats obtenus précédemment. D'une part, une stœchiométrie 1:1 entre le **5n** et la β CD a été mise en évidence par l'expérience de solubilité de phase et par celle utilisant la méthode des variations continues. D'autre part, une inclusion de **5n** par le côté large de la cavité de la β CD a été suggérée par l'étude de la géométrie du complexe **5n** : β CD par ^1H -RMN. Dès lors, 5 modes d'interactions possibles, correspondant à une stœchiométrie 1:1 et une inclusion de **5n** par le côté large de la cavité de la β CD ont été construits manuellement *via* le programme Discovery Studio 4.0. Ces structures simulées de complexe ont ensuite été optimisées par le programme GULP (Material Studio 6.1)[136]. Le **Tableau 18** présente les différences d'énergies obtenues pour chaque structure.

Tableau 18: Energie calculée (ΔE calculé par rapport à la plus basse énergie) correspondant aux différents modes d'interactions (complexes A-E) entre la β CD (gris) et **5n**.

Complexes	ΔE (kJ/mol)
A	39,8
B	9,7
C	0
D	32,3
E	27,4

A partir des résultats présents dans le **Tableau 18**, on remarque que les complexes B et C sont prédits comme étant les plus stables. Le complexe B représente une interaction entre la CD et la partie aromatique de **5n** alors que le complexe C représente une interaction entre le substituant propyle en position 9 et la CD. Or, l'interaction décrite par le complexe B peut être reliée avec les observations provenant des expériences ^1H -RMN où les protons aromatiques de **5n** étaient plus affectés par la présence de la CD, que les protons des substituants (**Figure 36**). Ceci permet de favoriser le complexe B entre **5n** et la β CD (**Figure 37**). En ce qui concerne les complexes A et E, la mauvaise stabilité de ces interactions pourrait être due à un encombrement stérique entre les substituants isopentyle et la CD, empêchant cette interaction. De plus, la faible stabilité du complexe D peut être expliquée par l'interaction défavorable de la charge positive du groupement pyridinium de **5n** au sein de la cavité hydrophobe de la CD.

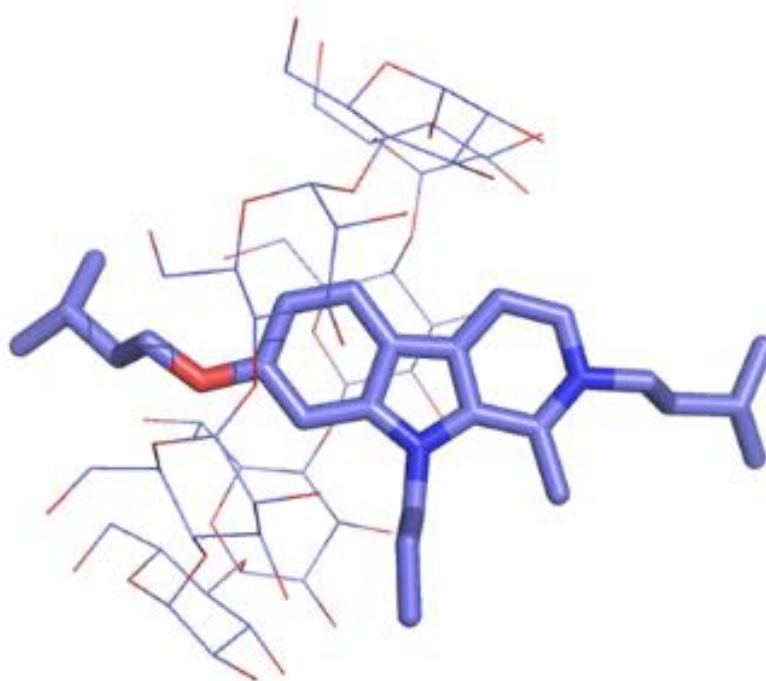


Figure 37: Géométrie optimisée du complexe B entre la β CD (lignes) et **5n** (sticks).

5. ETUDE PHARMACOLOGIQUE DU COMPLEXE

Le pouvoir antiprolifératif des complexes de **5n** : β CD et **5n** : 2HP- β CD a été évalué par un test de viabilité sur la lignée de cellules cancéreuses provenant du poumon (A549) et comparé au pouvoir antiprolifératif de **5n** seul (**Tableau 19**). La concentration permettant de diminuer la viabilité cellulaire de 50% (IC_{50}) est similaire pour les complexes **5n** : β CD et **5n** : 2HP- β CD avec respectivement, 0,19 μ M et 0,18 μ M. De plus, ces valeurs sont comparables à celle obtenue pour **5n** en absence de CD (0,16 μ M) indiquant que la complexation n'affecte pas le pouvoir antiprolifératif de **5n**.

Tableau 19: IC_{50} déterminée *in vitro* après 3 jours d'incubation en présence de **5n**, des complexes **5n** : β CD et **5n** : 2HP- β CD dans un rapport stœchiométrique 1:1 et des β CD et 2HP- β CD seules.

	Activité antiproliférative : IC_{50} déterminée sur A549 (μ M)	Intervalle de confiance à 95% (μ M)
5n	0,16	0,11-0,22
5n : 2HP- β CD	0,18	0,14-0,23
5n : β CD	0,19	0,15-0,25
2HP- β CD	NI ^a	-
β CD	NI	-

^aNI: Pas d'inhibition entre 0,01 μ M et 100 μ M

6. ETUDE DE LA SOLUBILITÉ DU COMPLEXE DANS L'EXCIPIENT

Ayant pour but d'étudier le composé **5n** *via* une administration par voie IV, la préparation du complexe **5n** : 2HP- β CD, pour une dose en **5n** de 1 mg.kg⁻¹ a été réalisée dans l'excipient (99,9% NaCl 0,9% m/v et 0,01% Tween-80). Cette formulation se présente sous forme de solution et non de suspension, contrairement à la formulation en **5n** seul dans le même excipient et pour la même dose, répondant ainsi à l'objectif fixé. Il serait, dès lors, intéressant d'évaluer la DMT pour cette nouvelle préparation après administration par voie IV.

7. CONCLUSIONS

Afin d'augmenter la solubilité thermodynamique de **5n**, la complexation avec diverses CD a été étudiée. Les résultats indiquent que cette complexation permet d'augmenter la solubilité de **5n**, notamment, en présence d'une CD composée de 7 sous-unités de glucose. Une expérience de solubilité de phase en présence de concentrations croissantes en 2HP- β CD a corroboré ce résultat et a mis en évidence une stœchiométrie 1:1 entre les deux molécules. Ce résultat est également confirmé par une expérience utilisant la méthode des variations continues en mesurant le déplacement chimique du proton H-3 de la CD par ^1H -RMN. De plus, une constante de stabilité de 116 M^{-1} et une efficacité de complexation de 0,28 ont été calculées pour des concentrations en 2HP- β CD allant jusqu'à 80 mM. Ces valeurs sont caractéristiques de ce type de complexe et confirment l'inclusion de **5n** au sein de la cavité de la CD. Une étude de la géométrie du complexe par ^1H -RMN et par optimisation de géométrie suggère que l'interaction de la partie aromatique indolique de la β -carboline interagit avec la cavité de la CD. De plus, un test de viabilité cellulaire en présence des complexes **5n** : 2HP- β CD et **5n** : β CD a mis en évidence que la complexation n'affecte pas le pouvoir antiprolifératif de **5n**. Finalement, le complexe **5n** : 2HP- β CD a été préparé dans l'excipient (99,9% NaCl 0,9% m/v et 0,01% Tween-80), pour une dose en **5n** de 1 mg.kg^{-1} , conduisant à une solution et non plus à une suspension. Ce résultat permet de mettre en perspective l'étude de l'activité anticancéreuse de **5n** après administration par voie IV du complexe **5n** : 2HP- β CD.

L'objectif de ce travail était de définir de nouvelles molécules possédant des propriétés anticancéreuses. Des dérivés de l'harmine synthétisés en tant qu'inhibiteurs de MAO-A ont montré qu'une monosubstitution en position 7 permettait d'accroître le pouvoir inhibiteur des composés par rapport à l'harmine. Par contre, la présence de deux ou trois substituants (positions 2, 7 et 9) sur le squelette de l'harmine induit une inactivité des composés. Étant donné que l'harmine et ses dérivés possèdent une activité antiproliférative sur divers lignées de cellules cancéreuses, les dérivés de l'harmine synthétisés initialement en tant qu'inhibiteurs de MAO-A ont été le point de départ de cette recherche[91].

La concentration permettant de diminuer la viabilité cellulaire de moitié (IC_{50}) a été déterminée par un test de viabilité (test MTT) sur trois lignées de gliomes humains (U373, Hs683 et T98G) ainsi que sur deux lignées de cellules cancéreuses humaines de l'œsophage (OE21, OE33), après 72 heures d'incubation en présence de dérivés de l'harmine. Ces résultats ont mis en évidence que la trisubstitution en positions 2, 7 et 9 par un groupement benzyle ($IC_{50}=0,7\pm0,4\mu M$) permettait d'augmenter fortement le pouvoir antiprolifératif de l'harmine ($IC_{50}=28\pm3\mu M$). Ce résultat a ensuite été confirmé par la synthèse et la caractérisation d'une vingtaine de molécules de première génération trisubstituées par des groupements apolaires. Les composés **1o**, **2p** et **2t** (**Figure 38**) présentent la meilleure activité antiproliférative ($0,34 < IC_{50} < 2,7 \mu M$). Cependant, ces molécules sont caractérisées par une faible solubilité au pH physiologique ($< 73 \mu g.mL^{-1}$) expliquée par l'importante lipophilie calculée pour ces trois molécules ($cLogP > 5$) (**Tableau 20**).

Dans le but d'accroître la solubilité des molécules, une seconde génération de composés a été synthétisée et caractérisée (**4f-h**) (**Figure 38**). Ces molécules portant des groupements polaires ont montré une importante amélioration de la solubilité au pH physiologique ($> 206 \mu g.mL^{-1}$) mais une perte d'activité antiproliférative sur les cinq lignées de cellules cancéreuses humaines étudiées ($IC_{50} > 100\mu M$) (**Tableau 20**).

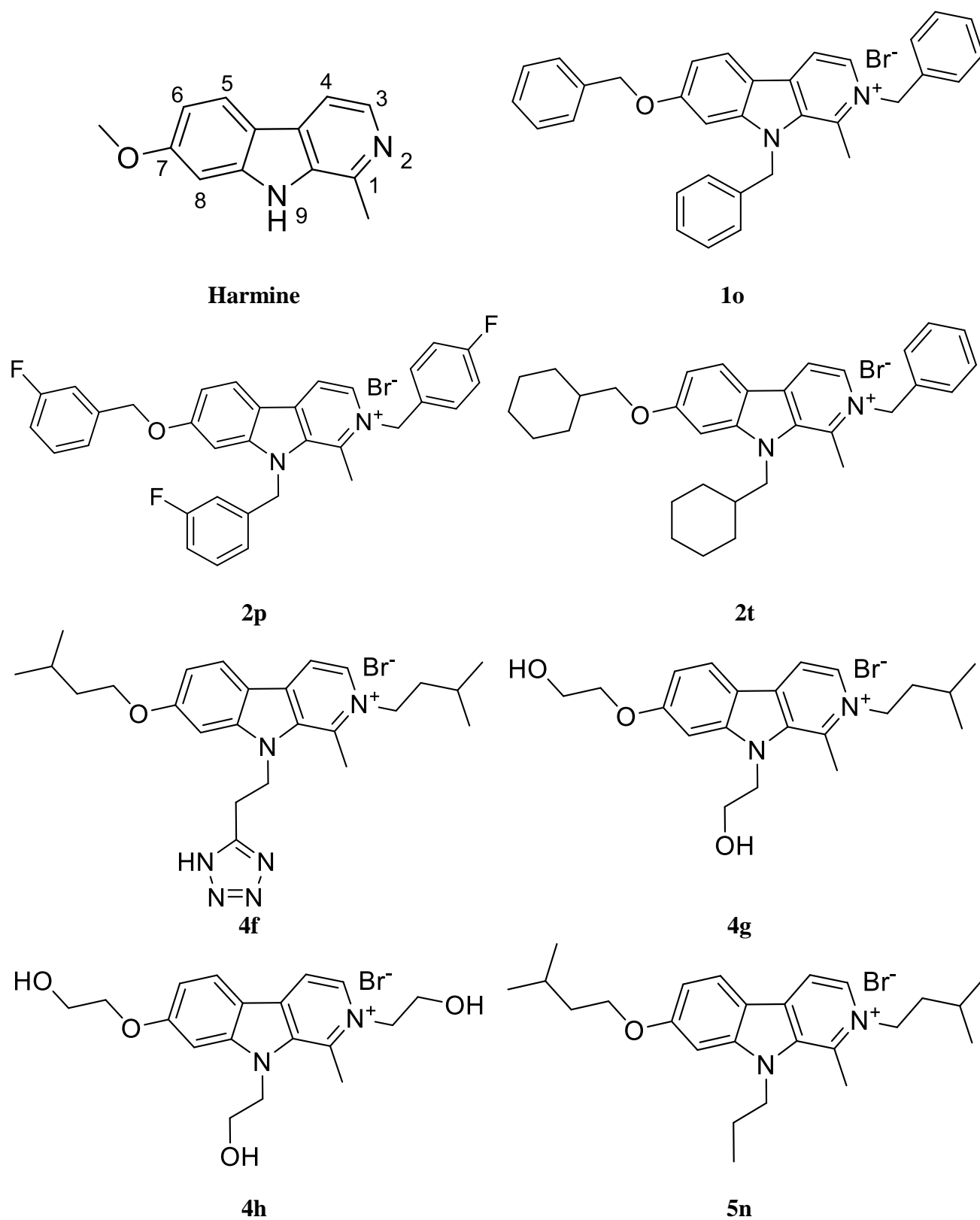


Figure 38: Structure des molécules **1o**, **2p**, **2t**, **4f-h**, **5n**.

Tableau 20 : Activité antiproliférative moyenne (IC₅₀) sur cinq lignées de cellules cancéreuses humaines, solubilité cinétique mesurée et lipophilie calculée (cLogP) pour l'harmine, ainsi que pour les molécules de première, deuxième et troisième génération.

	Activité		
	antiproliférative: IC ₅₀ moyenne ± SD ^a (μM)	Solubilité ± SD (pH 7,4 ; 25°C) (μg,mL ⁻¹)	cLogP
Harmine	28±3	ND ^b	ND
Molécules de 1^{ère} génération			
1o	0,7±0,4	73±4	5,27±1,51
2p	2,7±1,4	2±1	5,39±1,53
2t	0,34±0,10	<2	6,73±1,51
Molécules de 2^{nde} génération			
4f	>100	ND	1,86±1,54
4g	>100	>219	-1,11±1,51
4h	>100	>206	-2,60±1,52
Molécules de 3^{ième} génération			
5c	13±15	174±6	2,09±1,51
5f	6±9	196±5	2,46±1,51
5g	8±8	207±4	2,36±1,51
5i	1,3±1,4	207±4	2,43±1,51
5j	1,0±0,7	164±6	2,74±1,51
5k	0,6±0,4	186±5	2,95±1,51
5l	0,6±0,4	185±2	3,06±1,51
5n	<0,3	189±13	3,32±1,51

^aSD : Déviation standard. ^bND : Non déterminé

Afin de rationaliser l'ensemble des résultats obtenus sur la première et la deuxième générations de dérivés de l'harmine, un modèle 3D-QSAR a été élaboré et a permis d'établir une relation entre la structure tridimensionnelle des molécules et leur activité antiproliférative sur la lignée de cellules cancéreuses de gliomes Hs683. Ce modèle présente de bonnes statistiques et une importante capacité de prédiction de l'activité antiproliférative (pIC₅₀) pour les molécules composant le *training set* et le

test set ($q^2=0,397$, $r^2=0,872$). Le modèle ainsi généré a permis d'aider à la conception de molécules de troisième génération.

La visualisation de ce modèle a permis de mettre en évidence qu'un petit substituant en positions 2 et 9 était nécessaire pour garder une bonne activité antiproliférative. Par contre, le substituant en position 7 semble avoir peu d'importance (**Figure 39**). Afin de répondre à ces observations, douze nouvelles molécules ont été conçues. L'utilisation du modèle sur ces nouvelles molécules a également permis de prédire leur activité antiproliférative sur la lignée cellulaire de gliome Hs683. En plus de posséder une activité prédite de l'ordre du micromolaire à submicromolaire, les composés conçus sont également caractérisés par une plus faible lipophile ($\text{clogP}<3,4$) que les composés de la première génération ($\text{cLogP}>5$), encourageant ainsi la synthèse de ces nouvelles molécules de troisième génération.

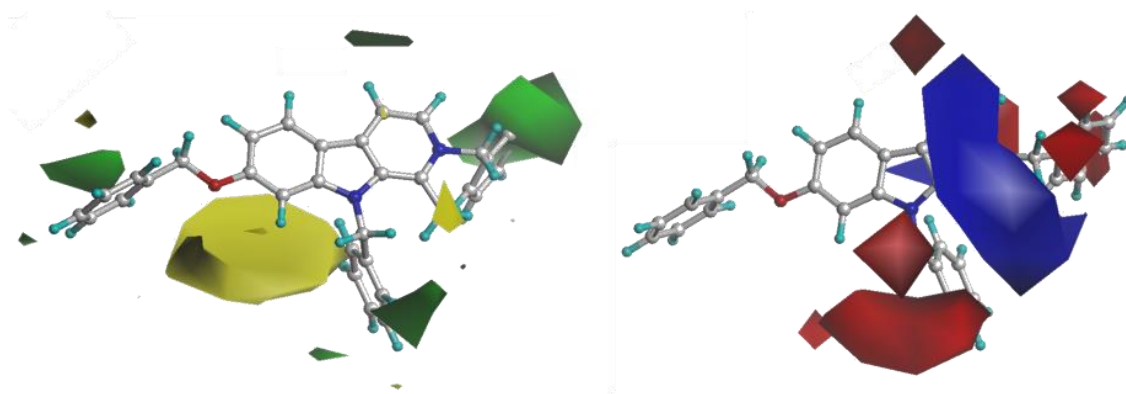


Figure 39: Carte de contour du modèle CoMFA autour de **1o**. (A) Champ stérique : les contours verts indiquent un emplacement favorable d'un groupement, d'un point de vue stérique, tandis que les contours jaunes indiquent un emplacement défavorable (B) Champ électrostatique : les contours bleus indiquent l'emplacement favorable pour une charge positive ou un groupement donneur de pont hydrogène, tandis que les contours rouges indiquent une région défavorable. Les isocontours favorables et défavorables représentent une contribution de 80% et 20% respectivement.

Ces prédictions ont été confirmées après synthèse et caractérisation de ces molécules puisque celles-ci combinent une activité antiproliférative de l'ordre du micromolaire à submicromolaire ($\text{IC}_{50}<13,8\mu\text{M}$) ainsi qu'une solubilité au pH physiologique plus importante ($164\text{-}207\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) que la première génération de molécules ($<73\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**5c-n**) (**Tableau 20**).

Parmi ces molécules de troisième génération, le composé **5n** (**Figure 38**) présente l'activité antiproliférative la plus importante ($\text{IC}_{50}<0,3\mu\text{M}$) et une bonne solubilité au pH physiologique ($189\ \mu\text{g.mL}^{-1}$). Ce composé apparaissant comme le plus intéressant a été évalué de manière approfondie dans la suite de ce travail.

La caractérisation pharmacologique et toxicologique de **5n** a été réalisée en trois temps. Dans un premier temps, une étude *in silico* a permis de suggérer un caractère très pénétrant de **5n** au niveau de la BHE. Ce résultat renforce *a priori* l'intérêt porté à l'étude du composé notamment dans le traitement de gliomes.

Dans un second temps, une étude *in vitro* a permis de mettre en évidence trois propriétés intéressantes du composé. D'une part, le composé **5n** présente une activité antiproliférative du même ordre de grandeur sur les deux lignées de cellules saines humaines de fibroblastes (BJ – IC₅₀=1,6µM) et de cellules endothéliales (HUVEC - IC₅₀=2,0µM). D'autre part, ces cellules saines sont moins sensibles à l'action antiproliférative de **5n** que les cellules cancéreuses A549 (IC₅₀=0,2µM) (**Tableau 21**). Ce résultat s'explique par un effet antiprolifératif induit par **5n** plus important sur A549 pour des concentrations comprises entre 1 et 10 µM. Cette propriété est notamment intéressante dans le développement de molécules présentant une toxicité sélective sur les cellules cancéreuses. Enfin, le composé est stable pendant huit heures au moins, dans du plasma humain reconstitué ; ceci est important dans le cadre du développement d'un futur médicament.

Tableau 21: Activité antiproliférative (IC₅₀) (µM) déterminée sur des cellules cancéreuses A549 et cellules saines BJ et HUVEC.

Type de cellules	Activité antiproliférative : IC ₅₀ (µM)	Intervalle de confiance à 95% (µM)	Indice de sélectivité ^a
Carcinome pulmonaire (A549)	0,20	0,15 – 0,21	-
Fibroblastes cutanés (BJ)	1,6	1,1 – 1,8	8
Cellules endothéliales (HUVEC)	2,0	1,3 – 2,9	10

Étant donné les propriétés très intéressantes observées pour **5n**, une étude de toxicité *in vivo* a été envisagée. La dose maximale tolérée de **5n** a été évaluée sur un groupe comprenant 6 souris. Les résultats ont mis en évidence l'absence d'effets indésirables pour une dose unique de 1 mg.kg⁻¹ administrée par voie intrapéritonéale, alors qu'une dose de 5 mg.kg⁻¹ entraîne un comportement amorphe des animaux après administration ainsi qu'un taux de survie de 67% en fin d'expérience. Il est à noter qu'un comportement amorphe suggère l'action potentielle du composé au sein du système

nerveux central. Dès lors, la dose de 1 mg.kg^{-1} a été choisie dans le but d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de **5n** *in vivo* sur un modèle murin induisant des métastases pulmonaires. Cette expérience consistait à comparer le temps de survie d'animaux traités trois fois par semaine pendant trois semaines par le témozolomide (80 mg.kg^{-1} , *per os*), d'animaux traités une fois par semaine pendant trois semaines par le **5n** (1 mg.kg^{-1} , IP) et d'animaux recevant uniquement l'excipient une fois par semaine pendant trois semaines (**Figure 40**).

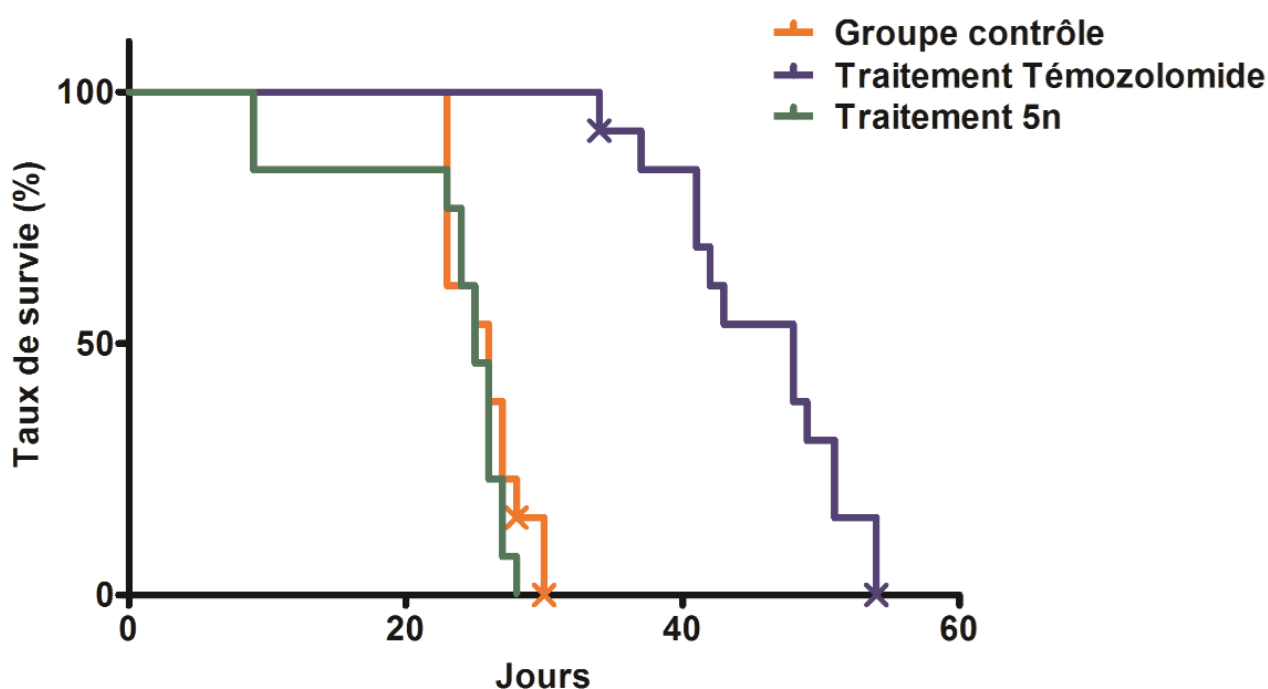


Figure 40: Détermination du taux de survie pour le groupe contrôle (treize animaux) traité par administration intrapéritonéale de l'excipient trois fois par semaine pendant une semaine (99,9% NaCl 0,9% m/v et 0,01% Tween-80), le groupe traité par une administration orale de témozolomide (80 mg.kg^{-1}) trois fois par semaine pendant trois semaines (treize animaux) et le groupe traité par administration intrapéritonéale de **5n** (1 mg.kg^{-1}) une fois par semaine pendant trois semaines (treize animaux), cinq jours après injection de 250 000 cellules B16F10 par souris. Les analyses statistiques (valeur de p) ont été déterminées par un test de Log-Rank. Non significatif ($p > 0,05$), très significatif ($p < 0,0001$). La présence de croix désigne l'euthanasie de l'animal.

Les résultats (**Figure 40**) ont mis en évidence une augmentation significative du temps de survie des animaux traités par le composé de référence, le témozolomide. Par contre, le temps de survie des animaux traités par le **5n** n'est significativement pas différent du temps de survie des animaux recevant uniquement l'excipient, permettant de conclure que le composé **5n** n'est pas actif sur le modèle utilisé.

Trois hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce résultat. La première est que la dose administrée est plus faible que la dose efficace. La seconde est que **5n** n'est pas actif sur le modèle utilisé. En effet, ce modèle permet l'étude de l'efficacité d'un composé sur le développement de métastases pulmonaires. Or les tumeurs primaires et les métastases présentent des propriétés différentes. La troisième hypothèse, renforcée par une étude pharmacocinétique réalisée sur **5n**, est qu'une trop faible résorption du composé après administration intrapéritonéale empêche d'atteindre la dose efficace au sein de la circulation sanguine. Or, l'administration intrapéritonéale de **5n** était inévitable puisque le composé se présente sous forme de suspension dans les deux excipients étudiés (99,9% NaCl 0,9% m/v / 0,01% Tween-80 ou 90% NaCl 0,9% m/v / 10% DMSO). Dès lors, la troisième partie du travail s'est consacrée à l'étude d'un mode de formulation permettant l'obtention d'une solution injectable de **5n** autorisant ainsi une administration par voie IV du composé.

Afin d'augmenter la solubilité de **5n**, la formation du complexe avec les cyclodextrines a été envisagée. Un premier criblage a mis en évidence l'accroissement de solubilité de **5n** en présence de cyclodextrines composées de 7 sous-unités de glucose, β CD et 2HP- β CD (β CD modifiée par des groupements 2-hydroxypropyles). Une expérience de solubilité de phase en présence de la 2HP- β CD a confirmé ce résultat (**Figure 41**). De plus, le complexe serait caractérisé par une stœchiométrie 1 : 1, résultat confirmé également par l'expérience utilisant la méthode des variations continues (méthode de Job). La constante de stabilité ($K_1 : 1=116 \text{ M}^{-1}$) et l'efficacité de complexation ($CE=0,28$) ont été calculées et correspondent à des valeurs habituellement obtenues pour des complexes de ce type.

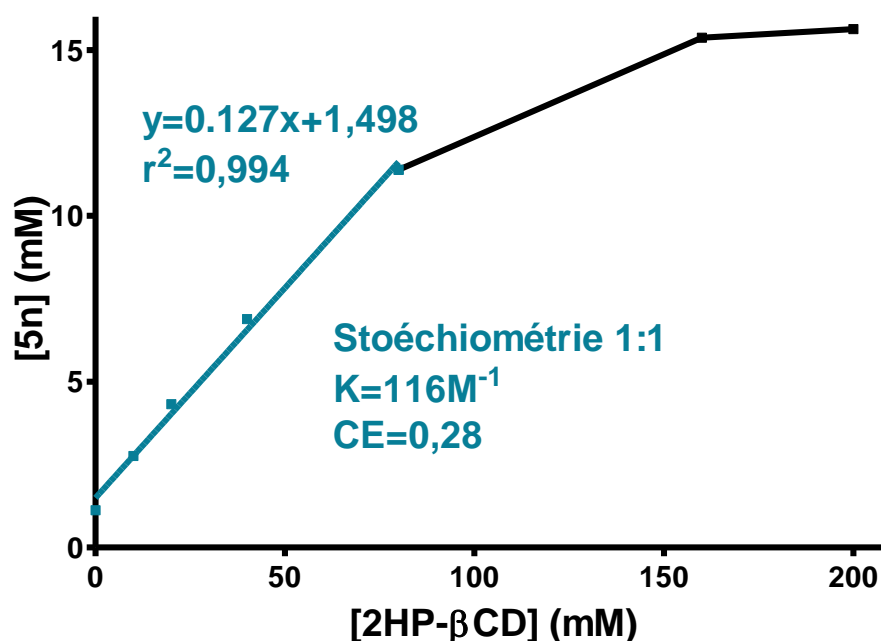


Figure 41: Diagramme de solubilité de **5n** en présence de 2HP- β CD dans un tampon phosphate (pH 7,4), à 25°C, après 72 heures d'agitation.

Une étude de la géométrie du complexe réalisée par ^1H -RMN et par optimisation de géométrie a permis de suggérer que la partie indolique de la β -carboline interagissait avec la cavité de la CD (**Figure 42**).

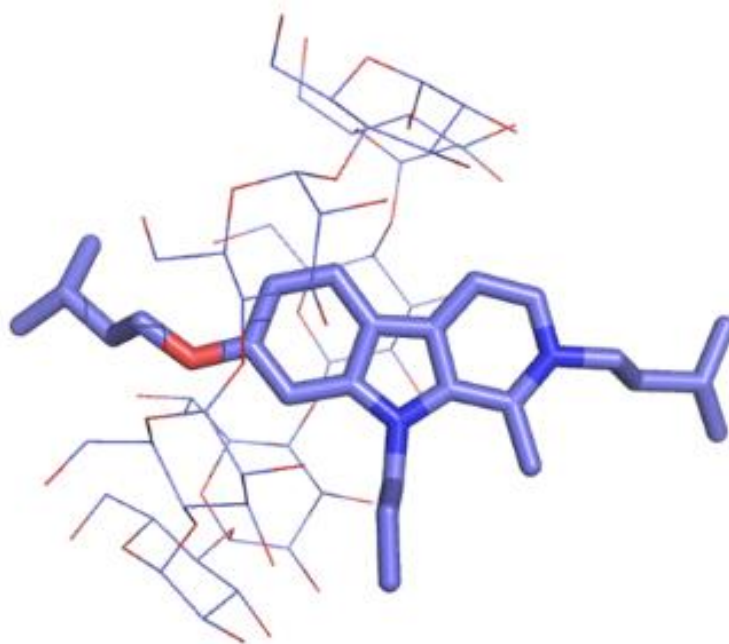


Figure 42: Géométrie optimisée du complexe entre la β CD (lignes) et **5n** (stick).

La détermination de la viabilité des cellules cancéreuses du poumon (A549) en présence des complexes **5n** : β CD et **5n** : 2HP- β CD (IC_{50} de respectivement 0,19 et 0,18 μM) a montré que la complexation n'influençait aucunement l'activité antiproliférative de **5n** ($\text{IC}_{50}=0,20\mu\text{M}$). Finalement, le complexe a été préparé dans l'excipient (99,9% NaCl 0,9% m/v / 0,01% Tween-80) pour une dose en **5n** de 1 mg.kg^{-1} et est présent sous forme de solution ; ceci permet de confirmer que l'objectif posé lors de cette troisième partie du travail a été atteint.

Enfin, tout au long de ce travail, un effort a été réalisé afin de définir le mécanisme d'action des molécules possédant les propriétés antiprolifératives les plus importantes. Plus particulièrement, deux stratégies ont été mises en place. La première se concentre sur la connaissance des effets induits par l'harmine *in vitro* afin d'estimer si les composés trisubstitués partagent ou non ces mécanismes. Dans le cadre de ce travail, deux de ces effets ont été évalués. Il s'agit de l'inhibition de la protéine kinase DYRK1A ainsi que de la capacité d'intercalation des composés au sein de la double hélice d'ADN. Cependant, les composés trisubstitués ne sont ni inhibiteurs de DYRK1A, ni des agents intercalant de l'ADN. La seconde stratégie consistait à évaluer le profil antiprolifératif des meilleurs composés sur les 60 lignées de cellules cancéreuses du Programme de Développement Thérapeutique du NCI. Ces profils antiprolifératifs ont ensuite été comparés, *via* l'algorithme COMPARE développé par le NCI, à ceux des 763.000 molécules peuplant la banque de données du NCI. Cette stratégie se base sur l'hypothèse

que des composés possédant des profils antiprolifératifs similaires sont caractérisés par des modes d'action semblables. Cette analyse a montré que les profils des molécules **1o**, **2p** et **5n** étaient corrélés avec ceux d'inhibiteurs de la synthèse protéique. Ce résultat a ensuite été confirmé par analyse de l'expression de la sous-unité du facteur d'initiation de la synthèse protéique (eIF2 α), montrant une diminution de l'expression de ce facteur en présence des molécules **1o** et **2p**. Afin de confirmer le pouvoir inhibiteur de la synthèse protéique de **5n**, une thèse de doctorat encadrée par le Pr. Véronique Mathieu est actuellement en cours au sein du Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB.

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées.

Il serait notamment intéressant d'évaluer la toxicité et l'efficacité du complexe **5n** : 2HP- β CD par voie IV. En effet, dans ce type d'administration, la concentration injectée est égale à la concentration présente dans la circulation sanguine, ce qui peut ne pas être le cas pour d'autres types d'injection. Dès lors, l'effet observé, qu'il soit positif ou non, reflèterait réellement le pouvoir anticancéreux de **5n**.

Une seconde perspective qui pourrait être couplée à la première serait d'étudier le comportement de **5n** sur la croissance de tumeurs *via* l'utilisation d'un modèle de tumeur sous-cutanée. Cette perspective est encouragée par des résultats présents dans la littérature qui soulignent la diminution de croissance tumorale *in vivo* induite par certains dérivés de l'harmine[63,64].

Dans le cadre de ce travail, deux projets de mémoires ont été encadrés dont le but était d'accroître la solubilité de **5n** *via* la synthèse et la caractérisation de nouveaux analogues[137,138]. Ces études ont mis en évidence l'augmentation de la solubilité et le maintien de l'activité antiproliférative micromolaire à submicromolaire pour des dérivés de **5n** portant un groupement 2- ou 4-méthylpyridine. Une étude pharmacologique et toxicologique de ces dérivés de quatrième génération permettraient d'évaluer l'intérêt de ces molécules en tant que futurs candidat médicament.

Afin de confirmer l'intérêt porté à l'étude du composé **5n** dans le traitement des gliomes, le pouvoir pénétrant de la BHE de la molécule pourrait être évalué expérimentalement. En effet, sur base du pouvoir fluorescent de **5n**, observé dans le cadre de ce travail, des coupes de cerveau d'animaux traités par **5n** pourraient être étudiées par microscopie à fluorescence. Les résultats permettraient, d'une part, de mettre en évidence la présence ou l'absence de **5n** au sein du cerveau et, d'autre part, ils permettraient de localiser le composé au sein de l'organe. La microscopie à fluorescence a été utilisée avec succès, par nos collaborateurs du Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr.

Véronique Mathieu), sur des cellules de gliomes Hs683 traitées par le **5n**. En effet, l'utilisation de cette technique a permis de mettre en évidence la capacité de pénétration rapide du **5n** au sein des cellules. Sur base de la capacité de fluorescence de **5n** au sein des cellules tumorales, ce composé pourrait également être étudié et utilisé en tant qu'outil pharmacologique.

Il serait également intéressant de poursuivre l'étude du mode d'action de **5n**. En effet, la connaissance de la cible principale de la molécule serait une aide primordiale pour la conception de nouvelles molécules. Plus précisément, des études basées notamment sur la connaissance de la structure de cette cible permettraient de rationaliser et d'optimiser les interactions entre les dérivés de l'harmine et celle-ci, afin d'accroître l'activité anticancéreuse des composés. Cette stratégie permettrait également d'augmenter la sélectivité des composés pour leur cible, restreignant ainsi les effets indésirables des futurs médicaments.

Bien que **5n** semble être un inhibiteur de la synthèse protéique et qu'il reste intéressant de confirmer ce mode d'action, l'étude d'autres modes d'action, basée sur ceux de l'harmine peut aussi être intéressante. En effet, l'ensemble des effets cellulaires observés après traitement par l'harmine serait ainsi utilisé comme base de travail pour évaluer le mode d'action de **5n**. Dans un premier temps, l'effet global de **5n** sur les caractéristiques des cellules cancéreuses pourrait être déterminé. A partir de ce résultat, l'action de **5n** engendrée au sein de la cellule pourrait être évaluée dans un deuxième temps, en se basant notamment sur les actions définies pour l'harmine (**Tableau 22**).

Tableau 22: Piste de travail pour l'évaluation du mécanisme d'action de **5n** en référence aux modes d'actions décrits de l'harmine.

1) Détermination de l'effet de global de 5n sur les cellules cancéreuses	2) Évaluation des cibles impliquées
Augmentation de facteur suppresseur de tumeur ?	Induction de p53 ?
Dégradation d'EGFR en surface des glioblastomes ?	Inhibition de DYRK1A : Non
Induction de l'apoptose et de la nécrose ?	Induction des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bid, Bad) ? ; inhibition des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1, Akt) ?; induction de l'expression TNF- α et Fas ?; inhibition de la topoisomérase 1 ? intercalation de l'ADN : Non
Induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de la sénescence ?	Inhibition des CDKs ? ; inhibition de l'expression de la télomérase ?
Inhibition de l'angiogenèse ?	Inhibition des facteurs pro-angiogéniques (NF- κ B, VEGF, cytokines pro-inflammatoires, iNOS, COX-2, MMP) ? ; induction des facteurs anti-angiogéniques (p53, Tsp-1, Bai-1, TIMP) ?
Inhibition de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases ?	Inhibition des facteurs pro-métastatiques (COX-2, MMP, VEGF, cytokines pro-inflammatoires, Erk) ?; induction facteurs anti-métastatiques (TIMP-1, TIMP-2, nm23) ?
Stimulation du système immunitaire ?	Induction d'IL-2 ? Inhibition de COX-2 ?

1. CHIMIE

1.1. Technique de purification

Les purifications ont été réalisées au moyen d'un appareillage de purification automatique Biotage AB SP1 équipé de colonnes pré-emballées de silice 25+M et 40+M Flash+ et d'un spectrophotomètre UltraViolet (UV) utilisé comme détecteur pour collecter les composés élués (longueur d'onde : 254 nm et 320 nm).

1.2. Techniques analytiques

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice (gel de silice GF 254, VWR), révélées à 254 nm.

Température de fusion

Les températures de fusion des composés ont été déterminées à l'aide d'un fusiomètre de type Buchi Melting point B-540 dans des capillaires ouverts.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été obtenus sur un spectromètre Jeol (JNM ECX 400) à une fréquence de 400 MHz (^1H), 100 MHz (^{13}C) et 376 MHz (^{19}F) à 25°C. Les déplacements chimiques sont reportés en partie par million (ppm) en utilisant le pic résiduel du solvant comme référence (DMSO- d_6 : δH : 2,50 ppm δC : 39,52 ppm; CD_3OD : δH : 3,31 ppm δC : 49,00 ppm). Les constantes de couplage (J) sont reportées en Hertz (Hz). La multiplicité de spin des signaux est représentée par les abréviations suivantes : s, singulet ; sl : singulet large ; d, doublet ; t, triplet ; q, quadruplet ; dd, doublet de doublet ; m, multiplet.

Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse (LC-MS)

Les analyses LC-MS ont été réalisées par une chromatographie liquide haute performance (HPLC) Agilent 1100 series, couplée à un spectromètre de masse MSD Trap SL générant une ionisation positive par électroébuliseur (ESI).

Plusieurs méthodes ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

Méthode A : l'analyse LC-MS consiste en l'injection de 10 μl d'une solution 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans l'acétonitrile sur une colonne Agilent Zorbax Sb-C18 (3,0 mm x 100 mm ; 3,5 μm). L'éluant est composé d'acide acétique 0,1% et d'acétonitrile au débit de 0,5 mL.min^{-1} (0-100% d'acétonitrile en 5 minutes ; 100% acétonitrile pendant 3 minutes ; 0% d'acétonitrile pendant 5 minutes). Cette méthode a été utilisée afin de déterminer le rapport masse sur charge du composé analysé (détection à 254 nm).

Méthode B : l'analyse LC-MS consiste en l'injection de 5 μL d'une solution 50 μM dans l'acétonitrile sur une colonne Kinetex hilic (100 x 2,1 mm: 2,6 μm) avec un éluant composé d'une solution d'acide acétique 0,2 % et d'acide trifluoroacétique 0,02 % dans l'eau (solution A) et dans l'acétonitrile (solution B) à un débit de 0,5 mL.min^{-1} (100-60% de solution B en 8 minutes ; retour vers 100% en solution B en 5 minutes). Cette méthode a été utilisée afin de déterminer la pureté des composés (détection à 220 nm et 254 nm).

Méthode C : l'analyse LC (non couplée au spectromètre de masse) consiste en l'injection de 10 μl d'une solution 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans l'éluant sur une colonne Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 (4,6 mm x 150 mm ; 5 μm). L'éluant est composé d'un mélange 70/30 (v/v) d'une solution 0,01 M de butanesulfonate de sodium dans le méthanol et d'une solution 0,01 M de butanesulfonate de sodium dans l'eau à un débit de 1,0 mL.min^{-1} . Cette méthode a été utilisée afin de déterminer la pureté des composés (détection à 220 nm et 254 nm).

Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)

Les analyses HRMS ont été réalisées sur un spectromètre de masse en tandem maXis Impact (Bruker) générant une ionisation positive par électroébuliseur (ESI-Q-TOF). L'analyte est dissout dans un mélange d'acétonitrile et d'eau 50/50 (v/v) et est infusé dans la source à un débit de 3 $\mu\text{L.min}^{-1}$. Ces analyses ont été réalisées par Monsieur Marc Dieu (Narilis - UNamur).

Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire (C, H, N) des composés a été réalisée au moyen d'un analyseur du type Thermo Finnigan - Flash EA 1112 series. Les analyses présentent une différence maximale de 0,4% par rapport aux valeurs déterminées théoriquement, et ce, pour chaque atome. Ces analyses ont été réalisées par Madame Anne-Marie Murray (NAMEDIC - UNAMUR).

La pureté des composés finaux a été évaluée soit par analyse élémentaire, par spectrométrie de masse haute résolution ou par la combinaison de deux méthodes de chromatographie liquide couplée ou non à un spectromètre de masse (*Méthodes B et C*).

1.3. Solvants et réactifs

Les solvants provenant de Biosolve et Sigma-Aldrich ont été utilisés sans purification supplémentaire. La DMF anhydre provient de Sigma-Aldrich. Tous les réactifs ont été achetés chez Interchim et Sigma-Aldrich et présentent une pureté supérieure à 95%, sauf notification. Les spectres RMN ont été réalisés dans du solvant deutéré provenant de chez Euriso-top.

1.4. Synthèses

Synthèse par irradiation micro-ondes

Les synthèses par irradiation micro-ondes ont été réalisées sur un appareil Biotage Initiator 2.0 dans des vials scellés de 20 mL (Biotage AB, Uppsala, Suède).

Procédure générale pour une alkylation simultanée des positions 7 et 9 (A)

L'harmol est dissout dans le N,N-diméthylformamide (DMF) (6 mL.mmol⁻¹). Cinq équivalents d'hydroxyde de potassium ($\geq 85\%$ - Merck) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 30 minutes sous argon. Ensuite, deux équivalents de bromure d'alkyle sont ajoutés. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures sous argon. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (85:15 dichlorométhane: éthanol) (v/v). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est extrait à l'aide de dichlorométhane (DCM). La phase organique est lavée à l'eau distillée et au NaCl saturé et séchée sur sulfate de magnésium. Finalement, la phase organique est évaporée sous

pression réduite pour donner le produit brut qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM : éthanol (100 : 0 jusqu'à 70 : 30) utilisé comme éluant.

Procédure générale pour une alkylation en position 7 (B)

L'harmol est dissout dans le DMF ($6 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Un équivalent et demi de bromure d'alkyle et trois équivalents de carbonate de césium sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24 heures à température ambiante, sous argon. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (85:15 DCM: éthanol) (v/v). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est extrait à l'aide de DCM. La phase organique est lavée à l'eau distillée et au NaCl saturé et séchée sur sulfate de magnésium. Finalement, la phase organique est évaporée sous pression réduite pour donner le produit brut qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM : éthanol (100 : 0 jusqu'à 80 : 20) utilisé comme éluant.

Procédure générale pour une alkylation en position 9 (C)

Le composé 1-méthyl-O₇-substitué-β-carboline est dissout dans le DMF anhydre ($40 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Un équivalent et demi de 1-iodopropane et cinq équivalents d'hydruure de sodium (60% dispersé dans de l'huile minérale – Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24 heures sous argon. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (85:15 DCM: éthanol) (v/v). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est extrait à l'aide de DCM. La phase organique est lavée à l'eau distillée et au NaCl saturé et séchée sur sulfate de magnésium. Finalement, la phase organique est évaporée sous pression réduite pour donner le produit brut qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM : éthanol (100 : 0 jusqu'à 87 : 13) utilisé comme éluant.

Procédure générale pour une alkylation en position 2 (D)

Le 1-méthyl-O₇-substitué-N₉-substitué-β-carboline est dissout dans le tétrahydrofurane (THF) ($60 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Dix équivalents de bromure d'alkyle sont ajoutés et le mélange est mis à reflux pendant 48 heures sous atmosphère d'argon. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (85:15 DCM: éthanol) (v/v). A la fin de la réaction, les solvants sont évaporés sous pression réduite pour donner le produit brut qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM : éthanol (95 : 5) utilisé comme éluant.

Procédure générale pour une alkylation en position 2 utilisant le réacteur micro-ondes (E)

Le 1-méthyl-O₇-substitué-N₉-substitué-β-carboline est dissout dans le THF (10 mL.mmol⁻¹). Dix équivalents de bromure d'alkyle sont ajoutés. Le mélange est placé dans le réacteur micro-ondes et la température a été maintenue constante à 140°C pendant 4 heures. A la fin de la procédure, le précipité formé est filtré sans purifications supplémentaires, ou le mélange est extrait au DCM. Dans ce cas, la phase organique est lavée à l'eau distillée et au NaCl saturé et séchée sur sulfate de magnésium. Finalement, la phase organique est évaporée sous pression réduite pour donner le produit brut qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM : éthanol (100 : 0 jusqu'à 80 : 20) utilisé comme éluant.

La synthèse des composés **1a-o** est décrite dans la littérature[90,91]. Les molécules **2a-ac** ont été synthétisées et caractérisées par Christelle Vancraeynest (Namedic - UNamur). Les rendements décrits pour chaque molécule n'ont pas été optimisés.

9-(3-fluorobenzyl)-7-(3-fluorobenzyloxy)-1-méthyl-β-carboline, **2a**:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure A à partir d'harmol (0,5 g, 1,587 mmol) en présence de 1-bromométhyl-3-fluorobenzène (0,6 g, 3,173 mmol). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 85%, T_f: 148°C, MS [M+H]⁺=415,1, R_f=0,8 (85 :15 DCM : éthanol), ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ: 2,70 (s, 3H, CH₃), 5,18 (s, 2H, O-CH₂), 5,87 (s, 2H, N-CH₂), 6,64 (d, 1H, J = 7,8 Hz, ArH), 6,72 (d, 1H, J = 10,1 Hz, ArH), 6,97 (dd, 1H, J₆₋₅ = 8,7 Hz, J₆₋₈ = 1,4 Hz, H-6), 7,01-7,13 (m, 2H, 2ArH), 7,26-7,40 (m, 5H, H-8 + 4ArH), 7,91 (d, 1H, J₄₋₃ = 5,0 Hz, 1H, H-4), 8,15 (d, 1H, J₅₋₆ = 8,9 Hz, H-5), 8,16 (d, 1H, J₃₋₄ = 5,5 Hz, H-3) ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) δ: 23,18, 47,36, 69,36, 95,45, 110,57, 112,76, 113,01, 114,52, 114,96, 115,07, 115,16, 121,78, 123,25, 124,26, 129,13, 130,94, 131,48, 135,41, 138,87, 140,33, 141,34, 142,59, 143,64, 160,06, 162,69, 162,94, ¹⁹F-RMN (DMSO-*d*₆) δ: -112,58 (s), -113,04 (s) ; Anal. Calculée pour C₂₆H₂₀F₂N₂O: C, 75,35%; H, 4,86%; N, 6,76%. Déterminée: C, 74,92%; H, 5,10%; N, 6,50 %.

9-(4-fluorobenzyl)-7-(4-fluorobenzyloxy)-1-méthyl-β-carboline, **2b**:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure A à partir d'harmol (0,5 g, 1,587 mmol) en présence de 1-bromométhyl-4-fluorobenzène (0,6 g, 3,173 mmol). Un solide brun est obtenu. Rendement : 62%, T_f:175°C, MS : [M+H]⁺=415,0, R_f=0,7 (85 :15 DCM : éthanol), ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ: 2,71 (s, 3H, CH₃), 5,13 (s, 2H, O-CH₂), 5,83 (s, 2H, N-CH₂), 6,89-6,95 (m, 3H, H-6 + 2ArH), 7,05-7,20 (m, 4H, 4ArH), 7,27 (d, 1H, J₈₋₆ = 1,8 Hz, H-8), 7,46-7,49 (m, 2H, 2ArH), 7,90 (d, 1H, J₄₋₃ =

5,0 Hz, H-4), 8,13 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,16 (d, 1H, $J_{3-4} = 5,3$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (DMSO-*d*6) δ : 23,22, 47,12, 69,48, 95,49, 110,54, 112,97, 115,03, 115,74, 116,15, 123,17, 127,85, 129,12, 130,69, 133,62, 135,41, 135,59, 138,77, 141,30, 143,60, 160,13, 161,77, 162,30; ^{19}F -RMN (DMSO-*d*6) δ : -114,28 (s), -115,68 (s). Anal. Calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: C, 75,35%; H, 4,86%; N, 6,76%. Déterminée: C, 75,37%; H, 5,43%; N, 6,97%.

9-cyclohexylméthyl-7-cyclohexylméthyloxy-1-méthyl- β -carboline, 2c:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure A à partir d'harmol (0,5 g, 1,587 mmol) en présence de 1-bromométhylcyclohexane (1,240 g, 3,173 mmol). Un solide blanc est obtenu. Rendement : 75%, T_f : 152°C, MS : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 391,2$, $R_f = 0,7$ (85 : 15 DCM : éthanol), ^1H -RMN (DMSO-*d*6) δ : 1,04-1,34 (m, 12H, 12ArH), 1,56-1,82 (m, 10H, 10ArH), 2,88 (s, 3H, CH_3), 3,90 (d, 2H, $J = 6,18$ Hz, O- CH_2), 4,36 (d, 2H, 7,10 Hz, N- CH_2), 6,81 (dd, 1H, $J_{6-5} = 8,7$ Hz, $J_{6-8} = 1,8$ Hz, H-6), 7,15 (d, 1H, $J_{8-6} = 1,8$ Hz, H-8), 7,83 (d, 1H, $J_{4-3} = 5,0$ Hz, H-4), 8,02 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,12 (d, 1H, $J_{3-4} = 5,0$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (DMSO-*d*6) δ : 23,74, 25,91, 26,36, 26,61, 29,92, 30,58, 37,75, 50,10, 73,62, 95,60, 109,93, 112,73, 114,35, 122,75, 129,11, 135,32, 138,19, 141,06, 144,11, 160,33. Anal. Calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}$: C, 79,96%; H, 8,77%; N, 7,17%. Déterminée: C, 79,81%; H, 8,86%; N, 6,95%.

9-isopentyl-7-(isopentyloxy)-1-méthyl- β -carboline, 2d:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure A à partir d'harmol (1,504g, 4,770 mmol) en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (1,440 g, 9,520 mmol). Un solide blanc est obtenu. Rendement : 69%; T_f : 106,4°C, MS : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 339,3$, $R_f = 0,8$ (85 : 15 DCM : éthanol), ^1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,98-1,00 (m, 12H, $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,55-1,93 (m, 6H, O- CH_2 - CH_2 - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ et N- CH_2 - CH_2 - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,90 (s, 3H, CH_3), 4,10 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, N- CH_2), 4,39 (m, 2H, O- CH_2), 6,34 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, 8,5 Hz, H-6), 6,87 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-8), 7,76 (d, 1H, $J_{4-3} = 5,3$ Hz, H-4), 7,94 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,05 (d, 1H, $J_{3-4} = 5,5$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 21,21, 21,63, 21,67, 25,01, 26,11, 37,87, 38,98, 42,91, 66,50, 93,38, 109,73, 112,19, 114,56, 122,14, 130,01, 134,95, 136,70, 140,11, 143,45, 160,89. Anal. Calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}$: C, 78,06%; H, 8,93%; N, 8,28%. Déterminée: C, 77,67%; H, 9,07%; N, 7,61%.

7-benzyloxy-1-méthyl-9-propyl- β -carboline, 2e:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure C à partir de **1k** (1,280 g, 4,45 mmol) en présence de 1-iodopropane (0,920g, 5,43 mmol) et d'hydruure de sodium (0,530 g, 22,2 mmol). Un solide brun est obtenu. Rendement : 52%; T_f : 113°C, MS : $[\text{M}+\text{H}]^+ = 331,2$, $R_f = 0,5$ (90 : 10 DCM : éthanol), ^1H -RMN (CDCl_3) δ : 0,98 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_2 - CH_2 - CH_3), 1,77-1,87 (m, 2H, CH_2 - CH_2 - CH_3), 3,00 (s, 3H, CH_3), 4,38 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, CH_2 - CH_2 - CH_3), 5,20 (s, 2H, O- CH_2), 6,93 (d, 1H, $J_{8-6} = 1,8$ Hz, H-

8), 6,96 (dd, 1H, $J_{6-5} = 8,5$ Hz, $J_{6-8} = 2,1$ Hz, H-6), 7,33-7,51 (m, 5H, ArH), 7,72 (d, 1H, $J_{4-3} = 5,3$ Hz, H-4), 7,97 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,5$ Hz, H-5), 8,28 (d, 1H, $J_{3-4} = 5,3$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CDCl_3) δ : 11,35, 23,47, 23,96, 46,47, 70,67, 94,99, 109,27, 112,38, 115,48, 122,46, 127,69, 128,21, 128,78, 129,36, 135,48, 136,92, 138,27, 140,66, 143,11, 159,98. Anal. Calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$: C, 79,97%; H, 6,71%; N, 8,48%. Déterminée: C, 79,6%; H, 6,64%; N, 8,21%.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-2-(2-fluorobenzyl)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2f:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **1m** (0,07 g, 0,185 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-2-fluorobenzène (0,35 g, 1,850 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 55%, $T_f > 200^\circ\text{C}$, MS : $[\text{M}]^+ = 487,2$, $R_f = 0,6$ (85 : 15 DCM : éthanol), ^1H -RMN (CD_3OD) δ : 2,94 (s, 3H, CH_3), 5,21 (s, 2H, O- CH_2), 5,93 (s, 2H, N- CH_2), 5,97 (s, 2H, N- CH_2), 6,98-7,01 (m, 3H, 3ArH), 7,15-7,34 (m, 10H, 8ArH + H-6 + H-8), 7,40-7,45 (m, 3H, 3ArH), 8,34 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,48 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,61 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 15,40, 48,78, 54,91, 70,40, 94,35, 113,30, 114,18, 114,47, 115,79, 121,30, 124,35, 125,09, 125,20, 127,51, 127,72, 127,88, 128,29, 128,68, 129,05, 131,13, 134,53, 135,71, 136,03, 136,32, 136,80, 139,43, 148,84, 160,34, 163,93, ^{19}F -RMN (CD_3OD) δ : -118,46 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %, Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-2-(4-fluorobenzyl)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2g:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **1m** (0,07 g, 0,185 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-4-fluorobenzène (0,35 g, 1,850 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 50%, $T_f > 200^\circ\text{C}$, MS : $[\text{M}]^+ = 487,2$, $R_f = 0,3$ (85 : 15 DCM : éthanol), ^1H -RMN (CD_3OD) δ : 2,90 (s, 3H, CH_3), 5,21 (s, 2H, O- CH_2), 5,90 (s, 2H, N- CH_2), 5,93 (s, 2H, N- CH_2), 6,97-7,41 (m, 16H, H-6, H-8, 14ArH), 8,34 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,50 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,4$ Hz, H-4), 8,62 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,4$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 15,36, 48,80, 59,67, 70,40, 94,36, 113,29, 114,27, 114,44, 115,98, 124,33, 125,21, 127,50, 127,70, 127,87, 128,28, 128,78, 129,05, 130,22, 134,52, 135,64, 136,11, 136,33, 136,86, 148,79, 162,86, 163,88, ^{19}F -RMN (CD_3OD) δ : -114,79 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 96 %.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-1-méthyl-2-(2-phényléthyl)- β -carbolin-2-ium, 2h:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **1m** (0,200 g, 0,541 mmol) a été mis en présence de 2-bromoéthylbenzène (0,977 g, 5,280 mmol) dans la DMF (10 mL). Un solide blanc est obtenu. Rendement : 32%, $T_f > 200^\circ\text{C}$, MS : $[\text{M}]^+ = 483,4$, $R_f = 0,4$ (85 : 15 DCM : éthanol), ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 2,91 (s, 3H, CH_3), 3,12 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, N- CH_2 -

CH_2), 4,88 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz, N- CH_2 - CH_2), 5,23 (s, 2H, N- CH_2), 6,01 (s, 2H, O- CH_2), 6,96-7,50 (m, 17H, H-8 + H-6 + 15 ArH), 8,39 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,50-8,53 (m, 2H, H-3 + H-4); ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 16,11, 36,37, 48,89, 58,28, 70,63, 95,60, 113,32, 114,13, 114,78, 125,31, 126,01, 128,65, 129,01, 129,51, 129,63, 133,39, 135,55, 135,95, 136,76, 136,85, 138,06, 139,85, 148,23, 163,19. Anal. Calculée pour $C_{34}H_{31}BrN_2O$: C, 72,47%; H, 5,54%; N, 4,97%. Déterminée: C, 72,18%; H, 5,50%; N, 4,99%.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-1-méthyl-2-propyl- β -carbolin-2-ium, 2i :

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **1m** (0,400 g, 1,057 mmol) a été mis en présence de 1-bromopropane (1,300 g, 10,569 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 7%, $T_f > 200^\circ C$, MS : $[M]^+ = 421,3$, $R_f = 0,3$ (85 :15 DCM : éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,98-1,07 (m, 3H, CH_3), 3,02 (s, 3H, CH_3), 4,58-4,61 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2), 5,19 (s, 2H, O- CH_2), 5,96 (s, 2H, N- CH_2), 7,04 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz, N- CH_2), 7,15-7,40 (m, 12H, H-8 + H-6 + 10 ArH), 8,30 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,40 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz H-4), 8,49 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,58, 14,88, 23,84, 58,77, 67,76, 70,34, 94,36, 113,26, 114,12, 124,17, 125,27, 127,48, 127,69, 127,84, 128,27, 129,08, 133,83, 134,96, 135,89, 136,37, 136,98, 138,88, 148,38, 163,54. Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 97%, 254 nm: 91 %.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-2-hexyl-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2j:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **1m** (0,200 g, 0,528 mmol) a été mis en présence de 1-bromohexane (0,872 g, 5,284 mmol) dans la DMF (10 mL). Un solide jaune-brun est obtenu. Rendement : 34% ; $T_f > 150^\circ C$; MS : $[M]^+ = 463,3$; $R_f = 0,8$ (85 :15 DCM : éthanol) ; 1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) : 0,87-0,92 (m, 6H, N- CH_2 - CH_2 - $(CH_2)_3$ - CH_3), 1,88-1,89 (m, 3H, N- CH_2 - CH_2 - $(CH_2)_3$ - CH_3), 3,02 (s, 3H, CH_3), 4,62 (m, 2H, N- CH_2 - CH_2), 5,19 (s, 2H, O- CH_2), 5,96 (s, 2H, N- CH_2), 7,03 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz, N- CH_2), 7,15-7,41 (m, 12H, H-8 + H-6 + 10 ArH), 8,30 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,40 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,49 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ (ppm) : 12,94, 13,08, 22,21, 25,72, 30,51, 31,07, 57,47, 67,62, 70,35, 94,32, 114,17, 124,14, 125,26, 127,48, 127,70, 127,84, 128,27, 128,52, 129,08, 131,05, 133,86, 134,89, 135,92, 136,36, 136,98, 148,38, 163,58. Pureté: Méthode B 220 nm: 96%, 254 nm: 98 %; Méthode C 220 nm: 93%, 254 nm: 91 %.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-2-isopentyl-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2k:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **1m** (0,400 g, 1,061 mmol) en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (1,596 g, 10,567 mmol). Un solide blanc est obtenu. Rendement :

17% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 449,2$; $R_f = 0,3$ (85 : 15 DCM : éthanol) ; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-*d*6) δ (ppm) : 0,91-0,92 (m, 6H, CH₃), 1,62-1,72 (m, 3H, CH₂-CH(CH₃)₂), 2,95 (s, 3H, CH₃), 4,59-4,63 (m, 2H, N-CH₂), 5,22 (s, 2H, O-CH₂), 6,00 (s, 2H, N-CH₂), 7,00-7,49 (m, 12H, H-8 + H-6 + 10 ArH), 8,41 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,59 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,67 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3) ; $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-*d*6) δ (ppm) : 16,12, 22,68, 26,01, 48,86, 56,27, 70,56, 70,64, 95,57, 113,35, 113,38, 114,07, 115,07, 125,25, 126,07, 128,07, 129,02, 129,62, 133,35, 135,64, 135,82, 136,71, 138,11, 139,64, 148,18, 163,18. Anal. Calculée pour C₃₁H₃₃BrN₂O : C, 68,00% ; H, 6,44% ; N, 5,12%. Déterminée : C, 67,96% ; H, 5,90% ; N, 5,04%.

Bromure de 9-benzyl-7-benzyloxy-2-(2-hydroxyéthyl)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2l :

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **1m** (0,400 g, 1,061 mmol) en présence de 2-bromoéthanol (1,32 g, 10,57 mmol). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 41% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 332,2$; $R_f = 0,2$ (85 : 15 DCM : éthanol), $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-*d*6) δ (ppm) : 2,98 (s, 3H, CH₃), 3,81 (d, 2H, $J = 4,35$ Hz, N-CH₂-CH₂-OH), 4,72 (t, 2H, $J = 4,81$ Hz, N-CH₂), 5,13 (t, 1H, $J = 4,92$ Hz, OH), 5,22 (s, 2H, O-CH₂), 6,02 (s, 2H, N-CH₂), 7,01 (d, 2H, $J = 6,87$ Hz, H-6 et H-8), 7,17 (dd, 1H, $J = 8,70$ Hz, 8,93 Hz, Ar-H), 7,23-7,53 (m, 9H, Ar-H), 8,41 (d, 1H, $J = 8,70$, H-5), 8,54-8,61 (m, 2H, H-3 et H-4) ; $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-*d*6) δ (ppm) : 16,506, 48,856, 59,335, 60,660, 70,633, 95,500, 113,310, 113,997, 114,493, 126,058, 128,108, 128,670, 129,014, 129,586, 135,497, 136,556, 136,765, 148,140, 163,128. Anal. Calculée pour C₂₈H₂₇BrN₂O₂ : C, 64,49% ; H, 5,61% ; N, 5,37%. Déterminée : C, 64,37% ; H, 5,12% ; N, 5,26%.

Bromure de 2-benzyl-9-(3-fluorobenzyl)-7-(3-fluorobenzyl)oxy-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2n :

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2a** (0,07 g, 0,169 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhylbenzène (0,289 g, 1,690 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 26% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 505,3$; $R_f = 0,4$ (85 : 15 DCM : éthanol), $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-*d*6) δ (ppm) : 2,90 (s, 3H, CH₃), 5,25 (s, 2H, O-CH₂), 5,94 (s, 2H, N-CH₂), 5,95 (s, 2H, N-CH₂), 6,73 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, ArH), 6,78 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, ArH), 6,98-7,38 (m, 13H, H-6 + H-8 + 11 ArH), 8,37 (d, 1H, $J_{5-6} = 9,4$ Hz, H-5), 8,52 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,65 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3) ; $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-*d*6) δ (ppm) : 15,33, 48,39, 60,47, 69,48, 94,41, 112,20, 113,47, 113,88, 114,39, 114,49, 120,99, 122,93, 124,48, 126,42, 128,58, 129,21, 130,10, 130,99, 134,17, 134,62, 135,95, 136,08, 139,22, 139,60, 139,75, 148,54, 163,02, 163,44, 163,60 ; $^{19}\text{F-RMN}$ (CD₃OD) δ (ppm) : -113,52 (s) ; -114,84 (s). Anal. Calculée pour C₃₃H₂₇BrF₂N₂O.2H₂O : C, 63,77% ; H, 5,03% ; N, 4,51%. Déterminée : C, 63,01% ; H, 4,84% ; N, 4,40%.

Bromure de 2-(2-fluorobenzyl)-9-(3-fluorobenzyl)-7-(3-fluorobenzyloxy)-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 2o:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2a** (0,07 g, 0,169 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-2-fluorobenzène (0,319 g, 1,690 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 48% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 523,1$; $R_f = 0,5$ (85 : 15 DCM : éthanol) ; $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2,94 (s, 3H, CH_3), 5,25 (s, 2H, O- CH_2), 5,95 (s, 2H, N- CH_2), 5,98 (s, 2H, N- CH_2), 6,74 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, ArH), 6,80 (d, 1H, 7,3 Hz, ArH), 6,98-7,08 (m, 3H, H-6 + 2ArH), 7,15-7,45 (m, 9H, H-8 + 8ArH), 8,36 (d, 1H, $J_{5-6} = 9,6$ Hz, H-5), 8,49 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,63 (d, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 15,24, 48,40, 55,00, 69,47, 94,41, 112,23, 113,45, 113,87, 114,31, 114,39, 114,44, 114,60, 115,80, 121,01, 121,27, 122,93, 124,51, 125,09, 128,77, 130,10, 131,00, 131,15, 134,65, 135,92, 135,99, 139,21, 139,69, 139,73, 148,62, 160,37, 163,00, 163,44, 163,65; $^{19}\text{F-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : -113,53 (s), -114,85 (s), -118,43 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %.

Bromure de 9-(3-fluorobenzyl)-2-(4-fluorobenzyl)-7-(3-fluorobenzyloxy)-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 2p:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2a** (0,125 g, 0,302 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-4-fluorobenzène (0,570 g, 3,020 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 92% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 523,1$; $R_f = 0,4$ (85 : 15 DCM : éthanol) ; $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2,90 (s, 3H, CH_3), 5,25 (s, 2H, O- CH_2), 5,92 (s, 2H, N- CH_2), 5,95 (s, 2H, N- CH_2), 6,74 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, ArH), 6,79 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, ArH), 6,97-7,03 (m, 2H, 2ArH), 7,10-7,35 (m, 10H, H-6 + H-8 + 8ArH), 8,37 (d, 1H, $J_{5-6} = 9,4$ Hz, H-5), 8,51 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,4$ Hz, H-4), 8,64 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 15,40, 49,24, 59,73, 69,47, 94,40, 112,23, 113,45, 113,87, 114,41, 114,51, 115,99, 121,01, 122,93, 124,50, 128,85, 130,10, 130,19, 131,00, 134,61, 135,81, 136,13, 139,22, 139,44, 139,74, 148,55, 162,89, 163,00, 163,43, 163,61; $^{19}\text{F-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : -113,53 (s), -114,76 (s), -114,87 (s). Anal. Calculée pour $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{BrF}_3\text{N}_2\text{O} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$: C, 63,77%; H, 4,54%; N, 4,51%. Déterminée: C, 63,29%; H, 4,24%; N, 4,32%.

Bromure de 2-benzyl-9-(4-fluorobenzyl)-7-(4-fluorobenzyloxy)-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 2q:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D à partir de **2b** (0,100 g, 0,241 mmol) en présence de 1-bromométhylbenzène (0,412 g, 2,410 mmol). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 72% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 585,48$; $R_f = 0,4$ (85 : 15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 2,90 (s, 3H, CH_3), 5,21 (s, 2H, O- CH_2), 5,92 (s, 2H, N- CH_2), 5,93 (s, 2H, N- CH_2), 6,97-7,45 (m, 15H, H-6, H-8, 13ArH), 8,35 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,51 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,4$ Hz, H-4), 8,64 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$

Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 15,38, 48,22, 60,44, 69,65, 94,39, 113,40, 114,27, 114,42, 114,98, 115,76, 124,40, 126,41, 127,23, 128,58, 129,20, 129,59, 132,42, 132,76, 134,19, 134,59, 135,86, 136,03, 139,49, 148,59, 162,41, 162,65, 163,70; ^{19}F -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : -116.02 (s), -116.39 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %.

Bromure de 2-(2-fluorobenzyl)- 9-(4-fluorobenzyl)- 7-(4-fluorobenzyloxy)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2r:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D à partir de **2b** (0,110 g, 0,265 mmol) en présence de 1-bromométhyl-2-fluorobenzène (0,502 g, 2,650 mmol). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 56% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[\text{M}]^+ = 523,0$; $R_f = 0,4$ (85 :15 DCM : éthanol); ^1H -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 2,94 (s, 3H, CH_3), 5,21 (s, 2H, O- CH_2), 5,92 (s, 2H, N- CH_2), 5,98 (s, 2H, N- CH_2), 7,00-7,06 (m, 7H, 7ArH), 7.16-7.23 (m, 4H, H-8, H-6, 2ArH), 7,40-7,45 (m, 3H, 3ArH), 8,34 (d, 1H, $J_{5-6} = 8.7$ Hz, H-5), 8.48 (d, 1H, $J_{4-3} = 6.6$ Hz, H-4), 8,62 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,4$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 15,28, 48,25, 54,96, 69,65, 94,40, 113,38, 114,24, 114,46, 114,98, 115,77, 115,79, 121,29, 124,44, 125,09, 127,26, 128,78, 129,58, 131,14, 132,41, 132,76, 134,63, 135,83, 135,95, 139,64, 148,67, 160.16, 162.53, 162.73, 163,75; ^{19}F -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : -116.05 (s), -116.40 (s), -118.43 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %.

Bromure de 2,9-di(4-fluorobenzyl)-7-(4-fluorobenzyloxy)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2s:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D à partir de **2b** (0,100 g, 0,241 mmol) en présence de 1-bromométhyl-4-fluorobenzène (0,456 g, 2,410 mmol). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 63% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[\text{M}]^+ = 523,0$; $R_f = 0,2$ (85 :15 DCM : éthanol); ^1H -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 2,92 (s, 3H, CH_3), 5,20 (s, 2H, O- CH_2), 5,92 (s, 4H, 2N- CH_2), 6,98-7,22 (m, 12H, H-6 + H-8 + 10ArH), 7,41-7,45 (m, 2H, 2ArH), 8,34 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,50 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,63 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 15,44, 48,23, 59,72, 69,67, 94,45, 113,40, 114,35, 114,42, 114,97, 115,76, 115,98, 124,41, 127,26, 128,85, 129,56, 130,19, 132,42, 132,75, 134,61, 135,74, 136,09, 139,51, 148,61, 162,43, 162,64, 162,89, 163,70; ^{19}F -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 114,73 (s), 116,05 (s), 116,40 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 96%, 254 nm: 97 %.

Bromure de 2-benzyl-9-cyclohexylméthyl-7-cyclohexylméthyloxy-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2t:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2c** (0,125 g, 0,32 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhylbenzène (0,547 g, 3,200 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 74% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[\text{M}]^+ = 480,3$; $R_f = 0,3$

(85 :15 DCM : éthanol); ^1H -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 1,07–1,44 (m, 12H, 12CH(cyclohexyl)), 1,61–1,95 (m, 10H, 10CH(cyclohexyl)), 3,10 (s, 3H, CH_3), 4,00 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$), 4,51 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2$), 6,00 (s, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2$), 7,08 (dd, 1H, $J_{6-5} = 8,9$ Hz, $J_{6-8} = 2,1$ Hz, H-6), 7,15–7,16 (m, 2H, 2ArH), 7,23 (d, 1H, $J_{8-6} = 2,1$ Hz, H-8), 7,35–7,44 (m, 3H, 3ArH), 8,25 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,43 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,60 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 15,62, 25,49, 25,66, 25,80, 26,27, 29,58, 30,28, 37,74, 40,24, 51,03 ($\text{N}-\text{CH}_2$), 60,42, 73,96, 94,52, 112,79, 113,84, 123,92, 126,36, 128,58, 129,25, 134,42, 134,53, 135,48, 135,54, 139,25, 149,14, 164,11. Anal. Calculée pour $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{BrN}_2\text{O}$: C, 70,58%; H, 7,36%; N, 4,99%. Déterminée: C, 69,93%; H, 7,34%; N, 4,85%.

Bromure de 2-(2-fluorobenzyl)-9-cyclohexylméthyl-7-cyclohexylméthyloxy-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2u:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2c** (0,110 g, 0,282 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-2-fluorobenzène (0,532 g, 2,820 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 53% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[\text{M}]^+ = 499,2$; $R_f = 0,4$ (85 :15 DCM : éthanol); ^1H -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 1,07–1,43 (m, 12H, 12CH(cyclohexyl)), 1,61–1,95 (m, 10H, 10CH(cyclohexyl)), 3,14 (s, 3H, CH_3), 4,00 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$), 4,53 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2$), 6,04 (s, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2$), 7,01–7,09 (m, 2H, H-6 + 1ArH), 7,20–7,27 (m, 3H, H-8 + 2 ArH), 7,43–7,48 (m, 1H, ArH), 8,24 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,42 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,58 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,4$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 15,51, 25,49, 25,66, 25,81, 26,27, 29,58, 30,27, 37,73, 40,25, 51,04, 54,83, 73,96, 94,49, 112,77, 113,82, 113,92, 115,83, 121,53, 123,94, 125,13, 128,57, 131,11, 134,57, 135,38, 139,32, 149,24, 160,36, 164,17; ^{19}F -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : -118,56 (s). Anal. Calculée pour $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{BrFN}_2\text{O} \cdot 0,2\text{H}_2\text{O}$: C, 64,38%; H, 7,20%; N, 4,55%. Déterminée: C, 64,59%; H, 7,00%; N, 4,35%.

Bromure de 2-(4-fluorobenzyl)-9-cyclohexylméthyl-7-cyclohexylméthyloxy-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2v:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D à partir de **2c** (0,100 g, 0,256 mmol) en présence de 1-bromométhyl-4-fluorobenzène (0,484 g, 2,560 mmol). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 76% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[\text{M}]^+ = 499,1$; $R_f = 0,3$ (85 :15 DCM : éthanol); ^1H -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 1,07–1,44 (m, 12H, 12CH(cyclohexyl)), 1,61–1,95 (m, 10H, 10CH(cyclohexyl)), 3,10 (s, 3H, CH_3), 4,00 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$), 4,52 (d, 2H, $J = 7,3$ Hz, $\text{N}-\text{CH}_2$), 5,98 (s, 2H, $\text{N}-\text{CH}_2$), 7,07 (dd, 1H, $J_{6-8} = 2,1$ Hz, $J_{6-5} = 8,9$ Hz, H-6), 7,14–7,25 (m, 5H, 4ArH + H-8), 8,25 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,7$ Hz, H-5), 8,44 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,4$ Hz, H-4), 8,60 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,6$ Hz, H-3); ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 15,67, 25,50, 25,66, 25,81, 26,27, 29,58, 30,29, 37,73, 40,28, 51,02, 59,67, 73,95, 94,48, 112,75, 113,86, 113,90, 116,03, 123,92, 128,78, 130,42, 134,51, 135,34, 135,49, 139,23, 149,13, 162,90, 164,10 (C_q); ^{19}F -RMN

(CD₃OD) δ (ppm) : -114,81 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 95%, 254 nm: 96 %.

Bromure de 2-(2-hydroxyéthyl)-9-(isopentyl)-7-(isopentyloxy)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2w:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **2d** (0,300 g, 0,886 mmol) en présence de 2-bromoéthanol (1,11 g, 8,86 mmol). Un solide brun est obtenu. Rendement : 69% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 383,4$; $R_f = 0,1$ (85 :15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (CD₃OD) δ (ppm) : 0,96-1,11 (m, 15H, OH, 2 $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,71-1,96 (m, 7H, CH₃, 2 $\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 4,06 (t, 2H, $J = 5,035$ Hz, N-CH₂-CH₂-OH), 4,23 (t, 2H, $J = 6,525$ Hz, N-CH₂), 4,63 (m, 2H, O-CH₂), 4,80 (m, 2H, N-CH₂), 7,07 (dd, 1H, $J = 8,70$ Hz, 8,70 Hz, H-6), 7,15 (d, 1H, $J = 1,83$ Hz, H-8), 8,21 (d, 1H, $J = 8,70$ Hz, H-5), 8,32 (d, 1H, $J = 6,54$ Hz, H-4), 8,42 (d, 1H, $J = 6,54$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD₃OD) δ (ppm) : 14,73, 20,72, 20,79, 24,17, 25,23, 36,80, 37,96, 43,41, 57,99, 59,87, 66,14, 92,67, 112,19, 112,58, 123,21, 133,08, 134,22, 138,40, 147,08, 163,8. Anal. Calculée pour C₂₄H₃₅BrN₂O₂: C, 62,20%; H, 7,61%; N, 6,04%. Déterminée: C, 61,42%; H, 7,37%; N, 5,64%.

Bromure de 2,9-diisopentyl-1-méthyl- -7-(isopentyloxy)- β -carbolin-2-ium, 2x:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **2d** (0,300 g, 0,886 mmol) en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (1,33 g, 8,86 mmol). Un solide brun est obtenu. Rendement : 29% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 409,4$; $R_f = 0,5$ (85 :15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : . 0,84-1,02 (m, 18H, 3 $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,15 (t, 3H, $J = 7,32$ Hz, 3 $\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,58-1,73 (m, 4H, N-CH₂-CH₂), 3,02-3,11 (m, 2H, O-CH₂-CH₂), 3,17 (s, 3H, CH₃), 4,21 (t, 2H, $J = 13,05$ Hz, N-CH₂-CH₂), 4,66 (t, 4H, $J = 7,55$ Hz, O-CH₂ et N-CH₂), 7,05 (dd, 1H, $J = 8,70$ Hz, 8,43 Hz, H-6), 7,29 (d, 1H, $J = 1,83$ Hz, H-8), 8,32 (d, 1H, $J = 8,93$ Hz, H-5), 8,52 (d, 1H, $J = 6,64$ Hz, H-4), 8,64 (d, 1H, $J = 6,64$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD₃OD) δ (ppm) : 9,11, 16,25, 22,75, 22,86, 22,96, 25,11, 26,12, 37,80, 39,11, 44,39, 46,18, 56,18, 67,34, 94,76, 113,11, 113,59, 114,79, 125,05, 133,10, 135,10, 135,29, 139,48, 147,46, 163,26. Anal. Calculée pour C₂₇H₄₁BrN₂O: C, 61,70%; H, 8,63%; N, 5,33%. Déterminée: C, 59,91%; H, 8,27%; N, 5,19%.

Bromure de 2-benzyl-9-isopentyl-7-(isopentyloxy)-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 2y:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **2d** (0,300 g, 0,886 mmol) en présence de 2-bromoéthylbenzène (1,64 g, 8,86 mmol). Un solide brun est obtenu. Rendement : 42% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 443,5$; $R_f = 0,3$ (85 :15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (CD₃OD) δ (ppm) : 0,96-1,11 (m, 12H, 2 $\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 1,48-1,97 (m, 8H, N-CH₂-CH₂-Ar, 2 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$), 3,05 (s, 3H, CH₃), 4,17-4,28 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-Ar), 4,58-4,71 (m, 2H, O-CH₂), 4,91-5,03 (m, 2H, N-CH₂), 7,29-7,01 (m, 7H, 5Ar-H, H-6, H-8), 8,34-8,15 (m, 3H, H-3, H-4, H-5); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD₃OD) δ (ppm) : 15,14,

21,54, 21,62, 24,98, 26,01, 36,53, 37,68, 38,78, 44,21, 58,11, 67,08, 93,49, 113,07, 113,60, 113,65, 123,99, 127,22, 128,64, 128,78, 133,78, 134,45, 134,93, 136,21, 138,71, 147,88, 163,93. Anal. Calculée pour $C_{29}H_{37}BrN_2O$: C, 66,24%; H, 8,44%; N, 5,35%. Déterminée: C, 65,94%; H, 8,24%; N, 4,90%.

Bromure de 2-benzyl-7-(benzyloxy)-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium bromide, 2z:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2e** (0,150 g, 0,454 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhylbenzène (0,773 g, 4,540 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide brun est obtenu. Rendement : 69% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 421,3$; $R_f = 0,2$ (85 : 15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 0,94 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,78-1,87 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3,12 (s, 3H, CH_3), 4,58 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 5,32 (s, 2H, O- CH_2), 5,99 (s, 2H, N- CH_2), 7,13-7,51 (m, 12H, 10ArH + H-6 + H-8), 8,27 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,43 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,4$ Hz, H-4), 8,60 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,4$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 9,86, 15,49, 23,51, 46,85, 60,44, 70,43, 94,57, 113,19, 114,03, 124,12, 126,44, 127,45, 127,89, 128,35, 128,58, 129,26, 134,18, 134,34, 135,33, 135,38, 136,60, 139,18, 148,13, 163,50. Pureté: Méthode B 220nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %.

Bromure de 7-benzyloxy-2-(2-fluorobenzyl)-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium, 2aa:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2e** (0,150 g, 0,454 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-2-fluorobenzène (0,858 g, 4,540 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement : 61% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 439,3$; $R_f = 0,6$ (85 : 15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 0,95 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,80-1,89 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3,16 (s, 3H, CH_3), 4,60 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 5,32 (s, 2H, O- CH_2), 6,04 (s, 2H, N- CH_2), 7,05-7,51 (m, 11H, 9ArH + H-6 + H-8), 8,26 (d, 1H, $J_{5-6} = 8,9$ Hz, H-5), 8,41 (d, 1H, $J_{4-3} = 6,6$ Hz, H-4), 8,58 (d, 1H, $J_{3-4} = 6,4$ Hz, H-3); $^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 9,87, 15,57, 23,50, 46,88, 54,88, 70,44, 94,56, 113,17, 114,02, 114,08, 115,82, 121,44, 124,16, 125,17, 127,45, 127,90, 128,35, 128,73, 131,14, 134,22, 135,25, 135,30, 136,58, 139,21, 148,22, 160,36, 163,56; $^{19}\text{F-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : -118.45 (s). Anal. Calculée pour $C_{29}H_{28}BrFN_2O$: C, 67,05%; H, 5,43%; N, 5,39%. Déterminée: C, 67,09%; H, 5,36%; N, 5,28%.

Bromure de 7-benzyloxy-2-(4-fluorobenzyl)-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium, 2ab:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure D avec une légère modification : le composé **2e** (0,150g, 0,454 mmol) a été mis en présence de 1-bromométhyl-4-fluorobenzène (0,858 g, 4,540 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide brun est obtenu. Rendement : 39% ; $T_f > 200^\circ\text{C}$; MS : $[M]^+ = 439,3$; $R_f = 0,6$ (85 : 15 DCM : éthanol); $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD) δ (ppm) : 0,95 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,79-1,89 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3,13 (s, 3H, CH_3), 4,59 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 5,32 (s,

2H, O-CH₂), 5,97 (s, 2H, N-CH₂), 7,13-7,52 (m, 11H, 9ArH + H-6 + H-8), 8,27 (d, 1H, J₅₋₆ = 8,9 Hz, H-5), 8,43 (d, 1H, J₄₋₃ = 6,4 Hz, H-4), 8,59 (d, 1H, J₃₋₄ = 6,6 Hz, H-3); ¹³C-RMN (CD₃OD) δ (ppm) : 9,86, 15,49, 23,49, 46,92, 59,70, 70,46, 94,61, 113,20, 114,06, 114,09, 116,04, 124,13, 127,44, 127,89, 128,35, 128,82, 130,33, 134,23, 135,17, 135,44, 136,60, 139,15, 148,18, 162,91, 163,56; ¹⁹F-RMN (CD₃OD) δ (ppm) : -114.81 (s). Pureté: Méthode B 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %; Méthode C 220 nm: 100%, 254 nm: 100 %.

9-benzyl-7-hydroxy-1-méthyl-β-carboline, 2ac:

Le composé **1m** (0,150 g, 0,40 mmol) est dissout dans du méthanol (10 mL), sous agitation. Du Pd/C 10% m/m (20 mg) est ajouté et le mélange est agité sous atmosphère d'hydrogène, à température ambiante et pendant 48 heures. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) (90:10 DCM: éthanol). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est filtré et évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut, qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM : éthanol (95 : 5) utilisé comme éluant. Un solide jaune est obtenu. Rendement : 89%, T_f : 234°C, MS [M+H]⁺=289,0, R_f=0,4 (85 :15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (CD₃OD) δ (ppm) : 2,90 (s, 3H, CH₃), 5,81 (s, 2H, N-CH₂), 6,88 (d, 1H, J₈₋₆ = 1,8 Hz, H-8), 6,94 (dd, 1H, J₆₋₅ = 8,7 Hz, J₆₋₈ = 1,8 Hz, H-6), 6,98 (d, 2H, J = 6,6 Hz, 2Ar-H), 7,23-7,32 (m, 3H, 3 Ar-H), 8,17 (d, 1H, J₅₋₆ = 8,7 Hz, H-5), 8,18 (d, 1H, J₃₋₄ = 6,0 Hz, H-3), 8,25 (d, 1H, J₄₋₃ = 6,0 Hz, H-4); ¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 17,25, 47,91, 94,93, 112,90, 112,99, 113,45, 124,01, 125,12, 127,58, 128,95, 130,34, 134,12, 134,34, 136,91, 137,33, 147,31, 162,26. Anal. Calculée pour C₁₉H₁₆N₂O.2H₂O: C, 70,31%; H, 5,93%; N, 8,43%. Déterminée: C, 70,35%; H, 6,21%; N, 8,64%.

7-(isopentyloxy)-1-méthyl-β-carboline, 3:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure B à partir d'harmol (1,98 g, 7,4 mmol) en présence de carbonate de césium (7,21 g, 22,2 mmol), 1-bromo-3-méthylbutane (1,4 mL, 11,1 mmol) dans 50 mL de DMF. Un solide jaune est obtenu. Rendement 65%, T_f 235-237°C, MS: [M+H]⁺ 269,0, R_f=0,4 (85:15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 0,92 (d, J=6,64Hz, 6H, CH-(CH₃)₂), 1,64 (m, 2H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 1,75-1,85 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 2,67 (s, 3H, CH₃), 4,06 (t, J=6,64Hz, 2H, O-CH₂), 6,79 (dd, J₆₋₈=2,06Hz, J₅₋₆=8,59Hz, 1H, H-6), 6,96 (d, J₆₋₈=2,06Hz, 1H, H-8), 7,75 (d, J₃₋₄=5,27Hz, 1H, H-4), 7,99 (d, J₅₋₆=8,47Hz, 1H, H-5), 8,10 (d, J₃₋₄=5,27Hz, 1H, H-3), 11,35 (sl, 1H, NH), ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 20,86, 23,02, 25,18, 37,98, 66,64, 95,76, 109,94, 112,43, 115,39, 123,12, 127,74, 135,05, 138,25, 141,761, 142,45, 159,96, Anal. Calculée pour C₁₇H₂₀N₂O: C, 76.09%; H, 7.51%; N, 10.44%. Déterminée: C, 76.08%; H, 7.56%; N, 10.17%.

7-(isopentyloxy)-1-méthyl-9-propionitrile- β -carboline, 4a:

Le composé décrit est synthétisé suivant une méthode décrite dans la littérature [94]. Le composé **3** (1,289 g, 4,5 mmol) et l'acrylonitrile (3,0 mL, 45 mmol) sont mélangés. L'addition goutte à goutte de Triton B (0,28 mL, 1,54 mmol) mène à l'apparition d'une solution rouge, suivie par CCM (85:15 DCM: éthanol). A la fin de la réaction, le mélange est extrait avec du DCM et la phase organique est lavée à l'eau distillée et à la saumure. Par la suite, celle-ci est séchée avec du sulfate de magnésium qui est écarté par filtration. Finalement, la phase organique est évaporée sous pression réduite afin d'obtenir l'extrait brut, utilisé sans purification supplémentaire. Un solide orange est obtenu. Rendement quantitatif, T_f : 166-167°C, MS: $[M+H]^+$ 322,0, $R_f=0,8$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (Acetone- d_6) δ : 0,97 (d, $J=6,64$ Hz, 6H, $CH-(CH_3)_2$), 1,68-1,74 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2$), 1,82-1,92 (m, 1H, $CH-(CH_3)_2$), 3,01 (s, 3H, CH_3), 3,10 (t, $J=6,87$ Hz, 2H, $N-CH_2-CH_2$), 4,18 (t, $J=6,64$ Hz, 2H, $O-CH_2$), 5,02 (t, $J=6,87$ Hz, 2H, $N-CH_2-CH_2$), 6,90 (dd, $J_{5-6}=8,59$ Hz, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-6), 7,33 (d, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-8), 7,81 (d, $J_{3-4}=5,04$ Hz, 1H, H-4), 8,04 (d, $J_{5-6}=8,04$ Hz, 1H, H-5), 8,20 (d, $J_{3-4}=5,27$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (Acetone- d_6) δ : 18,07, 22,06, 23,05, 25,03, 38,01, 40,17, 66,64, 94,25, 110,36, 112,02, 115,13, 117,80, 122,24, 129,42, 134,92, 138,81, 140,84, 142,64, 160,78.

7-(2-benzyloxyéthoxy)-9-(2-benzyloxyéthyl)-1-méthyl- β -carboline, 4b:

Le composé décrit est synthétisé selon la procédure A à partir d'harmol (1,98 g, 7,4 mmol) en présence de benzyl-2-bromoéthyle éther (2,4 mL, 14,8 mmol) et d'hydroxyde de potassium (2,10 g, 37 mmol) dans 40 mL de DMF. Un solide blanc est obtenu après recristallisation dans l'éthanol. Rendement : 52%, T_f 82-83°C, MS: $[M+H]^+$ 467,0, $R_f=0,9$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 2,92 (s, 3H, CH_3), 3,75-3,81 (m, 4H, $N-CH_2-CH_2 + O-CH_2-CH_2$), 4,20 (t, $J=5,04$ Hz, 2H, $O-CH_2$), 4,32 (s, 2H, CH_2-Ar), 4,54 (s, 2H, CH_2-Ar), 4,75 (t, $J=5,27$ Hz, 2H, $N-CH_2$), 6,86 (dd, $J_{5-6}=8,59$ Hz, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-6), 6,99-7,01 (m, 2H, Ar-H), 7,12-7,37 (m, 9H, Ar-H, Ar-H, H-8), 7,86 (d, $J_{3-4}=5,27$ Hz, 1H, H-4), 8,05 (d, $J_{5-6}=8,47$ Hz, 1H, H-5), 8,14 (d, $J_{3-4}=5,04$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (DMSO- d_6) δ : 23,85, 44,76, 68,08, 68,77, 69,42, 72,60, 72,68, 95,38, 110,27, 112,81, 114,89, 122,86, 127,45, 127,78, 127,99, 128,07, 128,59, 128,79, 129,04, 135,65, 137,88, 138,61, 138,86, 141,32, 143,54, 160,16.

Bromure de 7-(2-benzyloxyéthoxy)-9-(2-benzyloxyéthyl)-2-isopentyl-1-méthyl- β -carbolin-2-ium, 4c:

Le composé décrit est synthétisé selon la procédure E avec une légère modification : le composé **4b** (0,307 g, 0,6 mmol) a été mis en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (0,78 mL, 6,4 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide gris est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement: 33%, T_f 163-164°C, MS: $[M]^+$ 537,1, $R_f=0,4$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (DMSO- d_6) δ : 0,93 (d, $J=6,41$ Hz,

6H, CH-(CH₃)₂), 1,57-1,63 (m, 2H, N-CH₂-CH₂), 1,65-1,72 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 3,16 (s, 3H, CH₃), 3,80-3,85 (m, 4H, N-CH₂-CH₂ + O-CH₂-CH₂), 4,28-4,32 (m, 4H, O-CH₂ + CH₂-Ar), 4,56 (s, 2H, CH₂-Ar), 4,63 (t, J=6,18Hz, 2H, N-CH₂), 4,95 (t, J=4,81Hz, 2H, N-CH₂), 6,88-6,90 (m, 2H, Ar-H), 7,07-7,14 (m, 4H, Ar-H), 7,25-7,33 (m, 5H, Ar-H), 7,43 (s, 1H, Ar-H), 8,93 (d, J=8,93Hz, 1H, Ar-H), 8,52 (d, 1H, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-4), 8,62 (d, 1H, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-3), ¹³C-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 16,74, 22,71, 26,04, 45,83, 56,29, 68,54, 69,06, 72,67, 72,71, 95,67, 113,34, 113,77, 114,87, 124,93, 127,47, 127,90, 128,04, 128,08, 128,60, 128,82, 113,12, 135,36, 136,09, 138,36, 138,78, 139,99, 147,73, 162,94.

Bromure de 7-(2-benzyloxyéthoxy)-2,9-bis(2-benzyloxyéthyl)-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 4d:

Le composé décrit est synthétisé selon la procédure E avec une légère modification : le composé **4b** (0,394 g, 0,84 mmol) a été mis en présence de benzyl-2-bromoéthyléther (2,0 mL, 12,7 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide vert est obtenu. Rendement: 54%, T_f 149-150°C, MS: [M]⁺ 601,0, R_f=0,3 (85:15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 3,18 (s, 3H, CH₃), 3,81-3,87 (m, 6H, O-CH₂-CH₂ + N-CH₂-CH₂ + N-CH₂-CH₂), 4,30-4,34 (m, 4H, O-CH₂ + CH₂-Ar), 4,40 (s, 2H, CH₂-Ar), 4,55 (s, 2H, CH₂-Ar), 4,92 (m, 4H, N-CH₂ + N-CH₂), 6,91 (m, 2H, Ar-H), 7,10-7,17 (m, 9H, Ar-H), 7,25-7,33 (m, 5H, Ar-H), 7,41 (m, 1H, Ar-H), 8,32 (d, J=8,70Hz, 1H, Ar-H), 8,49 (d, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-4), 8,55 (d, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-4), ¹³C-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 17,14, 45,87, 56,99, 68,53, 68,69, 69,02, 72,54, 72,64, 72,67, 95,66, 113,31, 113,81, 114,24, 124,95, 127,50, 127,80, 127,88, 128,03, 128,09, 128,60, 128,72, 128,81, 133,36, 135,77, 136,17, 138,20, 138,33, 138,79, 140,60, 147,94, 162,99.

Bromure de 2-isopentyl-7-(isopentyloxy)-1-méthyl-9-propionitrile-β-carbolin-2-ium, 4e:

Le composé décrit est synthétisé selon la procédure E avec une légère modification : le composé **4a** (0,282 g, 0,9 mmol) a été mis en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (1,7 mL, 14 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement: 15%, T_f 199-201°C, MS: [M]⁺ 392,1, R_f=0,2 (85:15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 0,93-0,97 (m, 12H, CH-(CH₃)₂+ CH-(CH₃)₂), 1,66-1,74 (m, 5H, CH₂-CH-(CH₃)₂+ CH₂-CH-(CH₃)₂), 1,73-1,85 (m, 1H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 3,14 (t, J=6,41Hz, 2H, CH₂-CN), 4,20 (t, J=6,64Hz, 2H, O-CH₂), 4,69 (t, J=7,10Hz, 2H, N-CH₂), 5,07 (t, J=6,64Hz, 2H, N-CH₂), 7,08 (dd, J₆₋₈=1,83Hz, J₅₋₆=8,93Hz, 1H, H-6), 7,55 (d, J₆₋₈=1,60Hz, 1H, H-8), 8,32 (d, J₅₋₆=8,93Hz, 1H, H-5), 8,53 (d, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-4), 8,67 (d, J₃₋₄=6,64Hz, 1H, H-3), ¹³C-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 16,52, 18,69, 22,74, 22,98, 25,15, 26,02, 29,56, 37,84, 41,06, 56,30, 67,50, 95,41, 113,14, 114,19, 114,87, 119,12, 124,96, 133,62, 135,11, 135,97, 139,92, 147,39, 163,41.

Bromure de 9-(2-[1H-tetrazol-5-yl]éthyl)-2-isopentyl-7-(isopentyloxy)-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 4f:

Le composé décrit est synthétisé suivant une méthode décrite dans la littérature [94]. Le composé **4e** (0,349 g, 0,74 mmol), de l'azoture de sodium (0,217 g, 3,3 mmol) et du chlorure d'ammonium (0,155 g, 2,9 mmol) ainsi que 4 mL de DMF sont mis à reflux pendant 12h. La réaction est suivie par CCM (85:15 DCM: éthanol). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est extrait à l'aide de DCM. La phase organique est lavée à l'eau distillée et à la saumure. Par la suite, celle-ci est séchée avec du sulfate de magnésium qui est écarté par filtration. Finalement, la phase organique est évaporée sous pression réduite pour donner le produit brut, qui est purifié *via* une colonne de silice avec un mélange de DCM :éthanol (100 : 0 jusqu'à 50 : 50) utilisé comme éluant. Un solide blanc est obtenu après recristallisation dans l'éthanol. Rendement: 19%, HRMS calculée pour $C_{25}H_{35}N_6O^+$: 435,2867 [M]⁺. Déterminée: 435,2859, Rf=0,4 (50 :50 DCM : éthanol), ¹H-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 0,95-0,97 (m, 12H, CH-(CH₃)₂+ CH-(CH₃)₂), 1,64-1,74 (m, 5H, CH₂-CH-(CH₃)₂+ CH₂-CH-(CH₃)₂), 1,75-1,87 (m, 1H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 3,08 (s, 3H, CH₃) 3,19 (t, J=6,87Hz, 2H, CH₂-CN), 4,17 (t, J=6,41Hz, 2H, O-CH₂) , 4,60 (t, J=7,33Hz, 2H, N-CH₂), 4,96 (t, J=7,33Hz, 2H, N-CH₂), 7,00 (dd, J₆₋₈=1,83Hz, J₅₋₆=8,82Hz, 1H, H-6), 7,25 (d, J₆₋₈=1,83Hz, 1H, H-8), 8,28 (d, J₅₋₆=8,70Hz, 1H, H-5), 8,47 (d, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-4), 8,57 (d, J₃₋₄=6,64Hz, 1H, H-3).

Bromure de 7-(2-hydroxyéthoxy)-9-(2-hydroxyéthyl)-2-isopentyl-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 4g:

Le composé décrit est synthétisé à partir de **4c** (0,160 g, 0,26 mmol) en présence de Pd/C 10% m/m (41,6 mg, 0,04 mmol) et H₂ (1 bar) dans 20 mL d'éthanol. La réaction est suivie par CCM (85 :15 DCM : éthanol). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est filtré sur celite et évaporé sous pression réduite. Un solide jaune a été obtenu après recristallisation de l'extrait brut dans l'éthanol chaud. Rendement: 96%, T_f 232-234°C, HRMS Calculée pour $C_{21}H_{29}N_2O_3^+$: 357,2173 [M]⁺. Déterminée: 357,2174, Rf=0,1 (85:15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 0,96 (d, J=5,72Hz, 6H, CH-(CH₃)₂), 1,65-1,73 (m, 3H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 3,23 (s, 3H, CH₃), 3,76-3,83 (m, 4H, CH₂-OH + CH₂-OH), 4,19 (t, J=4,81Hz, 2H, O-CH₂), 4,69 (t, J=7,33Hz, 2H, N-CH₂), 4,77 (t, J=4,81Hz, 2H, N-CH₂), 4,95 (t, J=5,27Hz, 1H, OH), 5,03 (t, J= 5,27Hz, 1H, OH), 7,05 (dd, J₆₋₈=1,60Hz, J₅₋₆=8,82Hz, 1H, H-6), 7,35 (d, J₆₋₈=1,37Hz, 1H, H-8), 8,31 (d, J₅₋₆=8,93Hz, 1H, H-5), 8,51 (d, J₃₋₄=6,41Hz, 1H, H-4), 8,63 (d, J₃₋₄=6,64Hz, 1H, H-3), ¹³C-RMN (DMSO- *d*₆) δ : 16,78, 22,73, 26,04, 39,52, 47,94, 56,30, 59,96, 60,33, 70,96, 95,33, 113,20, 113,72, 114,73, 124,85, 132,89, 135,12, 136,06, 139,94, 147,71, 163,15.

Bromure de 7-(2-hydroxyéthoxy)-2,9-bis(2-hydroxyéthyl)-1-méthyl-β-carbolin-2-ium, 4h:

Le composé décrit est synthétisé à partir de **4d** (0,242 g, 0,37 mmol) en présence de Pd/C 10% m/m (20,0 mg, 0,018 mmol) et H₂ (1 bar) dans 20 mL d'éthanol. La réaction est suivie par CCM (85 :15 DCM : éthanol). A la fin de la réaction, le milieu réactionnel est filtré sur celite et évaporé sous pression réduite. Un solide jaune a été obtenu après recristallisation de l'extrait brut dans l'éthanol chaud. Rendement : 82%, T_f 192-194°C, MS: [M]⁺ 331,0, R_f=0,1 (85:15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 3,25 (s, 3H, CH₃), 3,77-3,86 (m, 6H, CH₂-OH + CH₂-OH + CH₂-OH), 4,19 (t, J=4,58Hz, 2H, O-CH₂), 4,75-4,80 (m, 4H, N-CH₂ + N-CH₂), 4,95 (t, J=5,04Hz, 1H, CH₂-OH), 5,04 (sl, 1H, CH₂-OH), 5,17 (sl, 1H, CH₂-OH), 7,05 (dd, J₆₋₈=1,37Hz, J₅₋₆=8,70Hz, 1H, H-6), 7,53 (d, J₆₋₈=1,37Hz, 1H, H-8), 8,31 (d, J₅₋₆=8,70Hz, 1H, H-5), 8,48-8,53 (m, 2H, H-4, H-3), ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 17,14, 47,95, 59,41, 59,96, 60,36, 60,69, 70,94, 95,35, 113,19, 113,68, 114,11, 124,83, 133,02, 135,83, 135,96, 140,59, 147,81, 163,16, Anal. Calculée pour C₁₈H₂₃BrN₂O₄: C, 52,56%; H, 5,64%; N, 6,81%. Déterminée: C, 52,96%; H, 5,72%; N, 6,40%.

7-(isopentyloxy)-1-méthyl-9-propyl-β-carboline, 5a:

Le composé décrit est synthétisé selon la procédure C à partir de **3** (1,265 g, 4,7 mmol) en présence de 1-iodopropane (1,198 g, 7,05 mmol) et d'hydruure de sodium (0,56 g, 23,5 mmol) dans 180 mL de DMF. Un solide rouge est obtenu. Rendement 83%, T_f 82-83°C, MS: [M+H]⁺ 311,1, R_f=0,8 (85:15 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 0,88 (t, J=7,33Hz, 3H, CH₂-CH₃), 0,93 (d, J=6,64Hz, 6H, CH-(CH₃)₂), 1,61-1,87 (m, 5H, CH₂-CH-(CH₃)₂ + CH₂-CH₃), 2,89 (s, 3H, CH₃), 4,11 (t, J=6,41Hz, 2H, O-CH₂), 4,47 (t, J=7,33Hz, 2H, N-CH₂), 6,81 (dd, J₅₋₆=8,59Hz, J₆₋₈=1,60Hz, 1H, H-6), 7,16 (d, J₆₋₈=1,60Hz, 1H, H-8), 7,82 (d, J₃₋₄=5,04Hz, 1H, H-4), 8,02 (d, J₅₋₆=8,47Hz, 1H, H-5), 8,12 (d, J₃₋₄=5,04Hz, 1H, H-3), ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 11,47, 23,05, 23,13, 24,16, 38,10, 25,15, 45,88, 66,88, 94,91, 109,92, 112,72, 114,62, 122,85, 128,93, 135,14, 138,23, 140,99, 143,38, 160,43, Anal, Calculée pour C₂₀H₂₆N₂O: C, 77,38%; H 8,44%; N, 9,02%. Déterminée: C, 77,27%; H, 8,47%; N, 8,81%.

1-méthyl-7-propoxy-9-propyl-β-carboline, 5b:

Le composé décrit est synthétisé selon la procédure A à partir d'harmol (1,50 g, 4,78 mmol), de 1-bromopropane (0,8 mL, 9,55 mmol) et d'hydroxyde de potassium dans 30 mL de DMF. Un solide jaune est obtenu. Rendement: 52%, T_f: 73-75°C, MS: [M+H]⁺ 283,2, R_f=0,40 (95:5 DCM: éthanol), ¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 0,87 (t, J=7,33Hz, 3H, CH₂-CH₃), 0,99 (t, J=7,33Hz, 3H, CH₂-CH₃), 3,31 (s, 3H, CH₃), 4,04 (t, J=6,64Hz, 2H, O-CH₂-CH₂), 4,46 (t, J=7,56Hz, 2H, O-CH₂-CH₂), 6,82 (dd, J₆₋₈=2,06Hz, J₅₋₆=8,70, 1H, H-6), 7,15 (d, J₆₋₈=1,83Hz, 1H, H-8), 7,83(d, J₃₋₄=5,04Hz, 1H, H-4)), 8,03(d, J₅₋₆=8,47Hz, 1H, H-5), 8,46 (d, J₃₋₄=5,04Hz, 1H, H-3), ¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) δ : 11,07, 11,47, 22,67, 23,57, 24,13, 45,88, 69,93, 94,85, 109,90, 112,74, 122,86, 128,92, 135,13, 138,21, 140,99, 143,37, 160,44.

Bromure de 2-éthyl-1-méthyl-7-propoxy-9-propyl-β-carbolin-2-ium, 5c:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **5b** (0,309 g, 1,15 mmol) en présence de 1-bromoéthane (0,8 mL, 10,5 mmol). Un solide blanc est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement 75%, T_f 218°C, MS: $[M]^+$ 311,3, $R_f=0,3$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 1,03 (t, $J=7,56$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1,10 (t, $J=7,33$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1,62 (t, $J=7,10$, 3H, $N-CH_2-CH_3$), 1,85-2,00 (m, 4H, $N-CH_2-CH_2+O-CH_2-CH_2$), 3,24 (s, 3H), 4,15 (t, $J=6,64$ Hz, 2H, $O-CH_2$), 4,64 (t, $J=7,79$, 2H, $N-CH_2$), 4,75 (q, $J=7,10$, 2H, $N-CH_2$), 7,05 (dd, $J_{6-8}=2,06$ Hz, $J_{5-6}=8,93$, 1H, H-6), 7,20 (d, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-8), 8,93 (d, $J_{5-6}=8,93$ Hz, 1H, H-5), 8,33 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-4), 8,46 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,56, 9,92, 14,84, 15,04, 22,27, 23,63, 46,80, 52,80, 70,13, 93,70, 112,90, 113,51, 114,09, 123,84, 133,69, 133,92, 135,09, 138,42, 147,99, 163,88, Anal, Calculée pour $C_{17}H_{20}BrN_2O$: C, 61,38%; H, 6,95%; N, 7,16%. Déterminée: C, 61,07%; H, 7,19%; N, 7,32%.

Bromure de 2-isopentyl-1-méthyl-7-propoxy-9-propyl-β-carbolin-2-ium, 5f:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **5b** (0,513 g, 1,8 mmol) en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (2,2 mL, 18,3 mmol). Un solide blanc est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement 13%, T_f 227-228°C, MS: $[M]^+$ 353,4, $R_f=0,3$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 1,00-1,16 (m, 12H, $CH-(CH_3)_2+CH_2-CH_3+CH_2-CH_3$), 1,80-1,99 (m, 7H, $CH_2-CH-(CH_3)_2+CH_2-CH_3+CH_2-CH_3$), 3,23 (s, 3H, CH_3), 4,15 (t, $J=6,41$ Hz, 2H, $O-CH_2$), 4,60-4,73 (m, 4H, $N-CH_2$, $N-CH_2$), 7,05 (dd, $J_{5-6}=8,70$ Hz, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-6), 7,20 (d, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-8), 8,21 (d, $J_{5-6}=8,93$ Hz, 1H, H-5), 8,33 (d, $J_{3-4}=6,41$ Hz, 1H, H-4), 8,47 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,56, 9,92, 21,33, 22,26, 23,60, 26,10, 39,35, 46,79, 56,18, 70,14, 93,70, 112,90, 113,53, 113,96, 123,85, 133,66, 134,32, 135,15, 138,26, 148,02, 163,91, Anal, Calculée pour $C_{23}H_{33}BrN_2O$: C, 63,74%; H, 7,67%; N, 6,46%. Déterminée: C, 64,09%; H, 7,85%; N, 6,66%.

Bromure de 7-(benzyloxy)-2-éthyl-1-méthyl-9-propyl-β-carbolin-2-ium, 5g:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **2e** (0,305 g, 0,9 mmol) a été mis en présence de 1-bromoéthane (0,7 mL, 9 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement 85%, T_f 217°C, MS: $[M]^+$ 359,2, $R_f=0,2$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,99 (t, $J=7,33$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1,61 (t, $J=7,33$ Hz, 3H, $N-CH_2-CH_3$), 1,84-1,93 (m, 2H, $N-CH_2-CH_2$), 3,23 (s, 3H, CH_3), 4,62 (t, $J=7,79$ Hz, 2H, $N-CH_2-CH_2$), 4,75 (q, $J=7,33$ Hz, 2H, $N-CH_2-CH_3$), 5,32 (s, 2H, $O-CH_2$), 7,14 (dd, $J_{5-6}=8,70$ Hz, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-6), 7,28-7,51 (m, 6H, Ar-H + H-8), 8,23 (d, $J_{5-6}=8,93$ Hz, 1H, H-5), 8,35 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-4), 8,47 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,90, 14,99, 23,52, 29,34, 46,83, 52,81, 70,40, 94,55, 113,15, 113,81, 114,24, 123,93, 127,44, 127,89, 128,35, 133,64, 133,90, 135,19, 136,65, 138,46, 147,81, 163,26, Anal.

Calculée pour $C_{24}H_{27}BrN_2O$: C, 65,60%; H, 6,19%; N, 6,38%. Déterminée: C, 65,94%; H, 6,35%; N, 6,27%.

Bromure de 7-(benzyloxy)-2-isobutyl-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium, 5i:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **2e** (0,41 g, 1,2 mmol) a été mis en présence de 1-bromo-3-méthylpropane (2,0 mL, 18 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu. Rendement 8%, T_f 237°C, MS: $[M]^+$ 387,3, $R_f=0,4$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,99(t, $J=7,56$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1,03 (d, $J=6,64$ Hz, 6H, $CH-(CH_3)_2$), 1,83-1,93 (m, 2H, CH_2-CH_3), 2,25-2,36 (m, 1H, $CH-(CH_3)_2$), 3,23 (s, 3H, CH_3), 4,55 (d, $J=7,56$ Hz, 2H, $N-CH_2$), 4,63 (t, $J=7,56$ Hz, 2H, $N-CH_2$), 5,32 (s, 2H, $O-CH_2$), 7,15 (dd, $J_{5-6}=8,82$ Hz, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-6), 7,28-7,52 (m, 6H, Ar-H + H-8), 8,25 (d, $J_{5-6}=8,93$ Hz, 1H, H-5), 8,34 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-4), 8,42 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,89, 15,21, 18,35, 23,57, 29,54, 46,87, 63,95, 70,41, 94,58, 113,17, 113,50, 113,87, 123,99, 127,44, 127,89, 128,35, 133,69, 135,12, 135,35, 136,64, 138,83, 147,91, 163,35, Anal. Calculée pour $C_{26}H_{31}BrN_2O$: C, 66,81%; H, 6,68%; N, 5,99 %. Déterminée: C, 66,61%; H, 6,81%; N, 5,75 %.

Bromure de 7-(benzyloxy)-2-isopentyl-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium, 5j:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **2e** (0,399 g, 1,2 mmol) a été mis en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (2,2 mL, 18 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide blanc est obtenu. Rendement 45%, T_f 222-224°C, MS: $[M]^+$ 401,3, $R_f=0,4$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,99 (t, $J=7,33$ Hz, 3H, CH_2-CH_3), 1,07 (d, $J=6,41$ Hz, 6H, $CH-(CH_3)_2$), 1,81-1,93 (m, 5H, CH_2-CH_3 + $CH_2-CH-(CH_3)_2$), 3,22 (s, 3H, CH_3), 4,62 (t, $J=7,56$ Hz, 2H, $N-CH_2$), 4,69 (t, $J=7,79$ Hz, 2H, $N-CH_2$), 5,32 (s, 2H, $O-CH_2$), 7,14 (dd, $J_{5-6}=8,93$ Hz, $J_{6-8}=2,06$ Hz, 1H, H-6), 7,28-7,52 (m, 6H, Ar-H + H-8), 8,23 (d, $J_{5-6}=8,93$ Hz, 1H, H-5), 8,34 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-4), 8,46 (d, $J_{3-4}=6,64$ Hz, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,90, 14,97, 21,31, 23,54, 26,10, 39,32, 46,85, 56,20, 70,40, 94,56, 113,15, 113,82, 114,07, 123,92, 127,43, 127,88, 128,35, 133,62, 134,32, 135,19, 136,65, 138,52, 147,82, 163,27, Anal. Calculée for $C_{27}H_{33}BrN_2O$: C, 67,35%; H, 6,91%; N, 5,82%. Déterminée: C, 67,10%; H, 6,77%; N, 5,93%.

Bromure de 2-éthyl-7-(isopentyloxy)-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium, 5k:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **5a** (0,309 g, 0,99 mmol) a été mis en présence de 1-bromoéthane (0,8 mL, 10,7 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement 42%, T_f 215°C, MS: $[M]^+$ 339,3, $R_f=0,2$ (85:15 DCM: éthanol), 1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,98-1,08 (m, 9H, $CH-(CH_3)_2$ + CH_2-CH_3), 1,61 (t, $J=7,33$ Hz, 3H, $N-CH_2-CH_3$), 1,76 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2$), 1,85-1,97 (m, 3H, CH_2-CH_3 +

$CH-(CH_3)_2$, 3,24 (s, 3H, CH_3), 4,23 (t, $J=6,41\text{Hz}$, 2H, $O-CH_2$), 4,66 (t, $J=7,79\text{Hz}$, 2H, $N-CH_2$), 4,75 (q, $J=7,33\text{Hz}$, 2H, $N-CH_2$), 7,06 (dd, $J_{5-6}=8,70\text{Hz}$, $J_{6-8}=2,06\text{Hz}$, 1H, H-6), 7,22 (d, $J_{6-8}=1,83\text{Hz}$, 1H, H-8), 8,22 (d, $J_{5-6}=8,70\text{Hz}$, 1H, H-5), 8,34 (d, $J_{3-4}=6,64\text{Hz}$, 1H, H-4), 8,46 (d, $J_{3-4}=6,64\text{Hz}$, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,92, 14,81, 15,02, 21,63, 23,63, 24,96, 37,73, 46,80, 52,79, 67,03, 93,71, 112,92, 113,54, 114,09, 123,84, 133,71, 133,90, 135,10, 138,42, 148,03, 163,86, Anal. Calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{BrN}_2\text{O}$: C, 63,00%; H, 7,45%; N, 6,68%. Déterminée: C, 62,85%; H, 7,38%; N, 6,71%.

Bromure de 7-(isopentyloxy)-1-méthyl-2,9-dipropyl- β -carbolin-2-ium, 5l:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E avec une légère modification : le composé **5a** (0,311 g, 1,00 mmol) a été mis en présence de 1-bromopropane (0,9 mL, 10,0 mmol) dans le THF (15 mL). Un solide jaune est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement 29%, T_f 206-208°C, MS: $[M]^+$ 353,3, $R_f=0,2$ (85:15 DCM: éthanol), ^1H -RMN (CD_3OD) δ : 1,00-1,10 (m, 12H, $CH-(CH_3)_2 + CH_2-CH_3 + CH_2-CH_3$), 1,73-1,78 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2$), 1,83-2,06 (m, 5H, $CH_2-CH_3 + CH_2-CH_3 + CH-(CH_3)_2$), 3,23 (s, 3H, CH_3), 4,23 (t, $J=6,64\text{Hz}$, 2H, $O-CH_2$), 4,66 (t, $J=7,79\text{Hz}$, 4H, $N-CH_2 + N-CH_2$), 7,06 (dd, $J_{5-6}=8,93\text{Hz}$, $J_{6-8}=2,06\text{Hz}$, 1H, H-6), 7,22 (d, $J_{6-8}=2,06\text{Hz}$, 1H, H-8), 8,22 (d, $J_{5-6}=8,93\text{Hz}$, 1H, H-5), 8,33 (d, $J_{3-4}=6,64\text{Hz}$, 1H, H-4), 8,46 (d, $J_{3-4}=6,64\text{Hz}$, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,66, 9,92, 14,96, 21,64, 23,64, 23,90, 24,96, 37,73, 46,81, 58,76, 67,05, 93,73, 112,92, 113,55, 113,76, 123,87, 133,71, 134,47, 135,14, 138,50, 148,05, 163,88, Anal. Calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{O}$: C, 63,74%; H, 7,67%; N, 6,46%. Déterminée: C, 63,37%; H, 7,74%; N, 6,65%.

Bromure de 2-isopentyl-7-(isopentyloxy)-1-méthyl-9-propyl- β -carbolin-2-ium, 5n:

Le composé décrit est synthétisé suivant la procédure E à partir de **5a** (0,499 g, 1,6 mmol) en présence de 1-bromo-3-méthylbutane (2,0 mL, 16 mmol). Un solide jaune est obtenu après cristallisation dans l'éthanol. Rendement 18 %, T_f 220-222°C, MS: $[M]^+$ 381,4, $R_f=0,3$ (85:15 DCM: éthanol), ^1H -RMN (CD_3OD) δ : 0,99-1,08 (m, 15H, $CH-(CH_3)_2 + CH_2-CH_3 + CH-(CH_3)_2$), 1,73-1,79 (m, 2H, $O-CH_2-CH_2$), 1,84-1,99 (m, 6H, $CH-(CH_3)_2 + CH-(CH_3)_2 + N-CH_2-CH_2 + N-CH_2-CH_2$), 3,23 (s, 3H, CH_3), 4,23 (t, $J=6,41\text{Hz}$, 2H, $O-CH_2$), 4,64-4,72 (m, 4H, $N-CH_2 + N-CH_2$), 7,06 (dd, $J_{5-6}=8,70\text{Hz}$, $J_{6-8}=2,06\text{Hz}$, 1H, H-6), 7,22 (d, $J_{6-8}=2,06\text{Hz}$, 1H, H-8), 8,22 (d, $J_{5-6}=8,93\text{Hz}$, 1H, H-5), 8,33 (d, $J_{3-4}=6,41\text{Hz}$, 1H, H-4), 8,46 (d, $J_{3-4}=6,41\text{Hz}$, 1H, H-3), ^{13}C -RMN (CD_3OD) δ : 9,91, 14,96, 21,32, 21,63, 23,62, 24,96, 26,11, 37,73, 39,34, 46,79, 56,16, 67,04, 93,72, 112,92, 113,56, 113,94, 123,85, 133,70, 134,31, 135,15, 138,36, 148,05, 163,90, , Anal. Calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{BrN}_2\text{O}$: C, 65,07%; H, 8,08%; N, 6,07%. Déterminée: C, 65,12%; H, 8,23%; N, 6,18%.

2. ÉTUDE *IN SILICO*

2.1. Développement du modèle CoMFA

L'activité antiproliférative déterminée *in vitro* sur la lignée humaine de gliomes Hs683 des molécules (inhibiteurs de MAO-A, première et deuxième générations) a été utilisée pour construire le modèle 3D-QSAR. Les valeurs d'IC₅₀ (M) obtenues sur cette lignée cellulaire ont été transformées en pIC₅₀ (-logIC₅₀). Les molécules faisant partie du *training set* (80% : 39 molécules) et du *test set* (20% : 9 molécules) ont été choisies de manière aléatoire par le programme Discovery Studio 3.5[101].

Alignement des molécules

L'écriture des molécules, sous forme SMILES, obtenue *via* le programme ChemDraw Ultra 13[139], ont été introduites dans le programme LigandScout 3.03[102].

L'alignement des molécules synthétisées en tant qu'inhibiteurs de MAO, de première génération et de seconde génération de dérivés de l'harmine a été réalisé avec l'aide du programme LigandScout 3.03. Cet alignement a été élaboré en deux étapes. La première consistait à générer un pharmacophore, en utilisant les molécules **1o**, **2k** et **2z** comme *training set*. A partir du pharmacophore obtenu, les informations relatives au tricycle aromatique commun ainsi qu'à la charge positive du pyridinium ont été retirées, permettant d'obtenir un pharmacophore biais. Un second alignement a ensuite été généré à partir des molécules **2j**, **2t**, **2x** et **2aa** prisent comme *training set* ainsi qu'en prenant en compte les informations relatives au pharmacophore biais. La succession de ces deux étapes a permis d'obtenir l'alignement des composés le plus optimal. Cet alignement a été réalisé dans le cadre d'un séjour au sein du l'Institut de pharmacie de la Freie Universität de Berlin, sous la supervision du Pr. Gerhard Wolber.

Détermination des valeurs d'énergies d'interaction

Le modèle CoMFA a été généré à partir du programme Sybyl 8.1 (TRIPOS Associates Inc.)[100]. La charge partielle des atomes a été déterminée *via* l'utilisation du champ de forces MMFF94s (Merck Molecular Force Field). Les énergies stériques et électrostatiques ont été mesurées en chaque nœud du réseau à l'aide d'un atome sonde. Cette sonde est constituée d'un atome de carbone sp³ avec un rayon de van der Waals de 1,52 Å pour le calcul du champ stérique et d'une charge de +1.0 pour le calcul du

champ électrostatique. Afin de ne pas prendre en compte des données d'énergies trop importantes, une valeur limite d'énergie de 30 kcal.mol⁻¹ est définie.

Corrélation des données structure – activité : Analyse des moindres carrés partiels

La corrélation entre les valeurs énergétiques calculées et les données biologiques expérimentales a été réalisée suivant la technique d'analyse des moindres carrés partiels. Cette technique permet de définir de nouvelles composantes qui sont des combinaisons linéaires des différentes variables.

Dans un premier temps, la technique de validation croisée, et plus précisément la technique du *leave-one-out*, a été utilisée afin de définir la capacité de prédiction du modèle. Cette technique consiste à retirer un échantillon du set de données original (n). Un modèle est construit à partir des n-1 données restantes. La valeur d'activité correspondant à la molécule exclue est ensuite prédite et comparée à la valeur obtenue expérimentalement. Cette opération est répétée n fois et les valeurs prédites sont comparées aux valeurs expérimentales, permettant de définir une valeur de coefficient de corrélation de validation croisée (q^2). Si cette valeur est égale ou supérieure à 0,3, correspondant à une limite de confiance à 95%, la probabilité d'accepter une corrélation par la chance est inférieure à 5%[103]. Lors de la validation croisée, le nombre optimal de composantes, permettant d'obtenir le modèle dont la capacité de prédiction est la plus importante, est également défini[140,141].

Dans un second temps, la technique de *bootstrapping* (« bien dans ses pompes ») a permis de construire le modèle proprement dit, sur base du nombre optimal de composantes déterminées au préalable. A partir des données de départ, de nouveaux sets d'échantillons sont construits. Ceux-ci ont la même taille que l'échantillon original mais peuvent contenir plusieurs fois la même molécule. Un modèle est créé pour ces différents sets d'échantillons. Les variances des paramètres obtenus pour chaque modèle créé permettent de définir la précision avec laquelle on estime le modèle final. En effet, plus la variance entre ces différents modèles est faible, plus la confiance apportée au modèle final sera importante. Lors de cette validation, un coefficient de corrélation conventionnel (r^2) est déterminé. Celui-ci doit être le plus proche de 1[140,141]. Une mesure de l'erreur standard d'estimation permet quant à elle de définir l'incertitude restante après réalisation du modèle et doit être la plus petite possible. La valeur du test de Fisher établit le rapport de l'expliqué sur l'inexpliqué et doit être le plus grand possible.

Utilisation du modèle CoMFA pour la prédiction de l'activité antiproliférative de nouvelles molécules

Le modèle CoMFA généré a permis de prédire l'activité antiproliférative (en pIC₅₀) sur la lignée de cellules de gliomes Hs683 de nouvelles molécules, avant leur synthèse.

L'écriture SMILES des molécules conçues a été introduite dans le programme LigandScout 3.03, en tant que *test set*. Ces molécules ont été alignées suivant la procédure décrite ci-dessus. La charge partielle des atomes a été déterminée *via* l'utilisation du champ de forces MMFF94s (Merck Molecular Force Field), présent au sein du programme Sybyl 8.1. Les molécules ainsi placées dans le réseau, les énergies stériques et électrostatiques ont été mesurées en chaque nœud du réseau. En utilisant la corrélation établie entre les données énergétiques et l'activité antiproliférative, une activité antiproliférative a pu être prédite pour chaque nouvelle molécule.

2.2. Prédiction du pouvoir pénétrant de la BHE

La pénétration de la barrière hématoencéphalique (BHE) a été calculée par le programme Discovery Studio 3.5[101]. Le modèle a été généré à partir de 102 composés présents dans le *training set* et 86 composés formant le *test set*. Ce modèle a ensuite été validé en utilisant deux séries de molécules. La première série correspond aux 881 molécules passant la BHE, composant la banque de données *Comprehensive Medicinal Chemistry* (CMC). La seconde série regroupe 124 composés dont la valeur de log BB est connue[101]. La prédiction de la pénétration de la BHE est divisée en quatre groupes (très importante à faible) inclus dans des ellipses à 95% et 99% de confiance. Les molécules pour lesquelles aucune prédiction n'a pu être faite sont exclues des ellipses de confiances.

2.3. Optimisation de la géométrie du complexe 5n : β CD

Les molécules d'eau ainsi que le ligand 4-hydroxybenzoate de méthyle complexant la β CD, ont été enlevés de la structure cristallisée du complexe (CSD-AJUVEG)[142,143]. Le composé **5n** a été construit à partir du programme Discovery Studio 4.0[101]. Les différents complexes entre **5n** et la β CD ont ensuite été construits manuellement en évitant tout contact entre les surfaces de van der Waals des deux composés constituant le complexe. Une optimisation de la géométrie de chaque complexe construit a ensuite été réalisée à partir du programme GULP (Material Studio 6.1), avec les valeurs par défaut et le champ de forces DREIDING.

3. ÉTUDE IN VITRO

➤ ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE

3.1. Détermination de la solubilité cinétique

Le test de solubilité cinétique est réalisé en deux étapes, selon une procédure adaptée de la littérature[144,145].

Droite de calibration

Une solution stock 10 mM dans 100% diméthylsulfoxyde (DMSO) du composé étudié est préparée et est utilisée pour la préparation de cinq solutions (500; 200; 50; 12,5; 3,13 μM – 5% DMSO) suivant le **Tableau 23**. 10 μL de ces solutions sont ensuite analysés par HPLC sur une colonne Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 (4,6 mm x 150 mm ; 5 μm) avec un éluant composé de butanesulfonate de sodium (0,01M) dans un mélange méthanol : eau (70 : 30) au débit de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La mesure de l'absorbance (254 nm) au cours du temps d'élution permet de définir l'aire sous la courbe, proportionnelle à la concentration en composé. La droite de calibration est obtenue en reportant l'aire sous la courbe obtenue pour chaque composé en fonction de la concentration de la solution.

Tableau 23 : Préparation des 5 solutions pour la calibration.

Solutions	Concentration (μM)	V _{solution stock} (μL)	V _{CH₃CN} (μL)	V _{DMSO} (μL)	V _{final} (μL)	% final DMSO
1	500	10	190	0	200	5
2	200	10	475	15	500	5
3	50	100 μL solution 2	285	15	400	5
4	12,5	100 μL solution 3	285	15	400	5
5	3,13	100 μL solution 4	285	15	400	5

Test de solubilité cinétique

Le test de solubilité a été réalisé en triplicat au moyen d'une plaque de filtration 96 puits Multiscreen® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). 10 μL de la solution stock (10 mM-100% DMSO) sont ajoutés à

190 μL de tampon phosphate pH 7,4. Après 1h30 d'agitation à 500 rpm, la plaque est filtrée au moyen d'un collecteur Millipore à 10-12'' mmHg pendant 30 à 60 secondes. 160 μL de filtrat sont transférés dans les puits d'une plaque 96-puits auquel 40 μL d'acétonitrile sont ajoutés. Après 5 minutes d'agitation à 200-300 rpm à température ambiante, les filtrats (200 μL) sont filtrés et analysés par HPLC suivant la même méthode que celle utilisée pour l'élaboration de la droite de calibration.

3.2. Détermination de la solubilité thermodynamique

La solubilité thermodynamique du **5n** a été évaluée dans du tampon phosphate (pH 7,4) suivant deux étapes.

Droite de calibration

Des solutions en **5n** allant de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été préparées dans le tampon phosphate, à partir d'une solution stock de 1 mg.mL^{-1} . L'absorbance, mesurée à 330 nm sur un spectrophotomètre Agilent Cary 5000, reportée en fonction de la concentration de la solution a permis d'établir la droite de calibration.

Test de solubilité thermodynamique

1 mL de tampon phosphate a été ajouté sur 5 mg de **5n** (excès). La suspension a été agitée à 25°C pendant 72 heures. Après filtration sur une membrane possédant des pores de 0,2 μm de diamètre (Life Sciences, 0,2 μm GHP Acrodisc) et une dilution d'un facteur 150 avec du tampon phosphate (pH 7,4), l'absorbance UV à 330 nm a été mesurée. L'utilisation de la droite de calibration a permis de déterminer la concentration en **5n** présente dans la solution.

3.3. Expérience de solubilité de phase

La complexation de **5n** avec la 2HP- β CD a été étudiée en suivant la méthode décrite par Higuchi and Connors[131]. Un excès de **5n** (15 mg) en présence de 1 mL de 2HP- β CD aux concentrations étudiées (de 0 mM à 200 mM dans un tampon phosphate à pH 7,4) a été mélangé pendant 72 heures à 25°C. Après filtration sur un filtre possédant des pores de 0,2 μm de diamètre (Life Sciences, 0,2 μm GHP Acrodisc), une dilution d'un facteur 150 avec du tampon phosphate a été réalisée. L'absorbance UV à 330 nm de chaque solution a été mesurée. A partir de ces valeurs mesurées et à l'aide d'une droite de calibration réalisée pour des concentrations en **5n** allant de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ préparée dans le

tampon phosphate, à partir d'une solution stock de 1 mg.mL^{-1} , la concentration en **5n** présente dans la partie soluble pu être déterminée. Etant donné que le diagramme de solubilité de phase présentait une réponse linéaire entre la concentration en **5n** soluble et la concentration en 2HP- β CD (profil de type A_L)[131] de 0 mM à 80 mM et que la pente était inférieure à l'unité, indiquant un complexe de stœchiométrie 1:1, la constante de stabilité apparente du complexe ($K_{1:1}$) a été calculée en utilisant les valeurs de pente et de solubilité intrinsèque (S_0) de **5n**, suivant l'Équation 1[133].

$$K_{1:1} = \frac{\text{pente}}{S_0 * (1 - \text{pente})} \quad \text{Équation 1}$$

Où $K_{1:1}$ est la constante de stabilité du complexe (M^{-1})

S_0 est la solubilité intrinsèque de **5n** (M)

Pente est la pente de la régression linéaire

L'efficacité de complexation (CE) a été calculée sur base des valeurs de la solubilité intrinsèque (S_0) et de la constante de stabilité apparente du complexe ($K_{1:1}$), suivant l'Équation 2[133].

$$CE = S_0 * K_{1:1} \quad \text{Équation 2}$$

Où CE est l'efficacité de complexation

S_0 est la solubilité intrinsèque de **5n** (M)

$K_{1:1}$ est la constante de stabilité du complexe (M^{-1})

3.4. Détermination de la stœchiométrie du complexe **5n** : β CD (méthode de Job)

La détermination de la stœchiométrie du complexe **5n** : β CD a été déterminée suivant la méthode des variations continues (méthode de Job). Des solutions de **5n** et β CD pour des fractions molaires r allant de 0 à 1 ($r = [\beta\text{CD}] / ([\beta\text{CD}] + [\text{5n}])$) ont été réalisées et ce en maintenant une concentration totale ($[\beta\text{CD}] + [\text{5n}]$) de 2 mM pour chaque expérience avec un volume constant de 1 mL. Ces solutions ont été mises à agiter à 25°C pendant 72 heures. Les déplacements chimiques du proton H-3 de la β CD ont été déterminés en absence (δ_{libre}) et en présence (δ_{complexe}) de **5n**, pour chaque solution. La différence $\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\text{libre}}$ a ensuite été calculée et le produit $|\Delta\delta| \cdot [\beta\text{CD}]$ a été reporté pour les différentes fractions molaires en β CD. La valeur maximale obtenue correspond à un r de 0,53, indiquant une stœchiométrie du complexe de 1:1.

➤ Étude biologique et pharmaceutique

3.5. Evaluation de la viabilité cellulaire (test MTT)

Les tests de viabilité cellulaire ont été réalisés à partir d'un protocole décrit dans la littérature[146]. Ces tests de viabilité cellulaire ont été réalisés sur différentes lignées humaines de cellules cancéreuses provenant de gliomes (U373, T98G, Hs683), de mélanome (SKMEL-28), de cancer du poumon non à petites cellules (A549) et de cancer du sein (MCF-7) ainsi que sur des lignées humaines de cellules saines de fibroblastes de peau immortalisées (BJ) et de cellules endothéliales provenant de la veine du cordon ombilical (HUVEC). Les tests de viabilité cellulaire sur les cellules cancéreuses ont été réalisés par nos collaborateurs du Laboratoire de Cancérologie et Toxicologie Expérimentale de l'ULB (Pr. Véronique Mathieu). Les tests de viabilité cellulaire sur les cellules saines ont été réalisés au laboratoire, sur des cellules fournies par le Pr. Carine Michiels (URBC, UNamur).

Le test de viabilité cellulaire consiste en un test colorimétrique au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) qui mesure le nombre de cellules métaboliquement actives qui sont capables de convertir le MTT (couleur jaune) en formazan (couleur mauve) au moyen d'une réduction par la succinate déshydrogénase mitochondriale (**Figure 43**). La concentration de formazan formée est mesurée par spectrophotométrie et est directement proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives, soit les cellules vivantes.

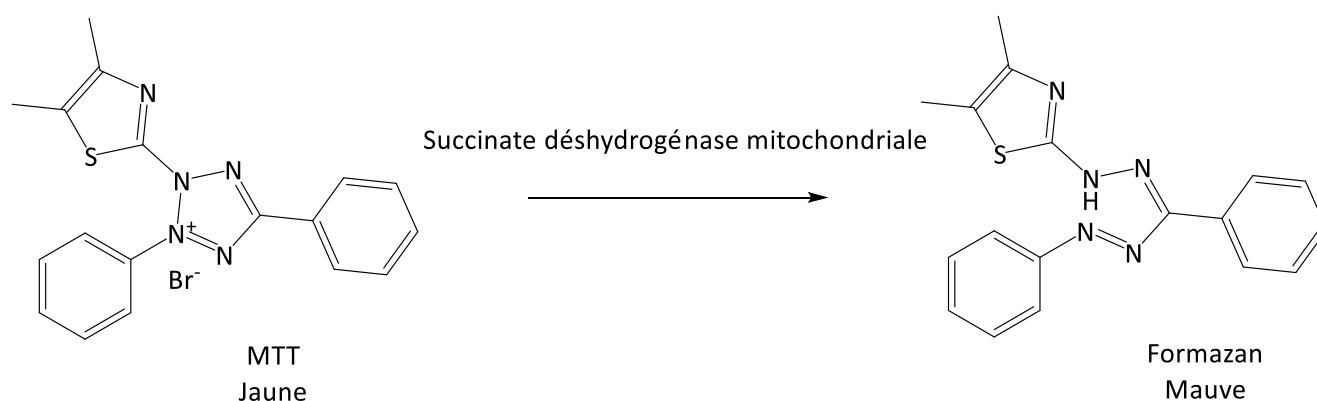


Figure 43: Conversion du MTT en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale.

Au jour 0, les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits (Cellstar®). Après 1 jour d'incubation à 37°C, 8 solutions contenant le composé étudié et préparées dans du milieu cellulaire [RPMI 1640 avec glutamine 200 mM, Hepes 25 mM, PenStrep (10 000 unités PEN + 10 mg Strep par mL), 10% FBS],

pour des concentrations allant de 10 nM à 100 µM, sont réalisées. 100 µL de chaque condition est ajouté aux cellules (sextuplat). De plus, 100 µL de milieu cellulaire [RPMI 1640 avec glutamine 200 mM, Hepes 25 mM, PenStrep (10 000 unités PEN + 10 mg Strep par mL), 10% FBS], sans composé, sont également ajouté aux cellules (sextuplat) afin de déterminer la viabilité cellulaire de cellules non traitées. Après 3 jours d'incubation à 37°C, le milieu cellulaire est enlevé et 100 µL d'une solution de MTT (0,5 mg.mL⁻¹) préparée dans du milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol est ajouté sur les cellules. Après 4 heures d'incubation à 37°C, la plaque est centrifugée à 1200 rpm pendant 6 minutes afin de culoter les cristaux de formazan formés. Ensuite, le surnageant est enlevé et les cristaux sont solubilisés dans 100 µL de DMSO. La plaque est laissée sous agitation à 200 rpm pendant 5 minutes. Enfin, la lecture de l'absorbance est effectuée à 570 nm et 655 nm, pour chaque concentration testée, au moyen d'un spectrophotomètre.

L'activité métabolique, représentant la viabilité cellulaire, est déterminée par comparaison avec le contrôle cellulaire (cellules non traitées) suivant l'**Équation 3**.

$$\text{Activité métabolique (\%)} = 100 * \frac{A_{\text{composé}}}{A_{\text{contrôle}}} \quad \text{Équation 3}$$

Où $A_{\text{composé}}$ représente l'absorbance mesurée en présence du composé étudié (570 nm)

$A_{\text{contrôle}}$ représente l'absorbance mesurée en absence du composé étudié (570 nm)

Les résultats sont transcrits au moyen d'une courbe d'inhibition représentant le pourcentage d'activité métabolique en fonction du logarithme de la concentration en composé testé. La concentration permettant de réduire l'activité métabolique de 50% (IC₅₀) est déterminée (GraphPad Prism 5.0).

Afin de déterminer le comportement des cellules en présence du composé, l'activité métabolique au jour 1 (lors de l'ajout du composé) est également déterminée suivant le même test.

3.6. Détermination de la stabilité plasmatique de 5n

La stabilité plasmatique de **5n** a été étudiée dans le plasma humain récupéré après centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes de sang humain récolté dans des tubes héparinés de 2 mL. Le test permettant d'évaluer la stabilité plasmatique est réalisé en deux étapes.

Droite de calibration

Une solution stock 20 mg.mL⁻¹ en **5n** dans 100% DMSO est préparée et est utilisée pour la préparation de 4 solutions (20 ; 8, 4 ; 0,8 mg.mL⁻¹ -100% DMSO) (solution **1** ; **2** ; **3** ; **4**), suivant le **Tableau 24**. Les solutions **1**, **2** et **4** sont ensuite employées dans la préparation des solutions **1***, **2*** et **4*** (2 ; 0,8 ; 0,08

mg.mL⁻¹ - 55 % DMSO-45% NaCl 0,9 (m/v) utilisées afin d'établir la droite de calibration (**Tableau 24**).

Tableau 24: Préparation des solutions **1***, **2*** et **4*** nécessaires à l'élaboration de la droite de calibration. Les solutions stocks (**1,2** et **4**) sont préparées dans du DMSO 100% à partir d'une solution en **5n** de 20 mg.mL⁻¹. Ces solutions sont ensuite diluées afin d'obtenir les solutions correspondantes (**1***, **2*** et **4***) dans du DMSO 55% et NaCl 0.9% (m/v) 45%.

Solutions stock 100% DMSO				Solution 55% DMSO-45% NaCl 0.9% (m/v)					
Sol	[5n] (mg.mL ⁻¹)	V _{stock} solution (μl)	V _{DMSO} (μl)	Sol	[5n] (mg.mL ⁻¹)	Masse de 5n dans 100 μL de plasma (μg)	V de la solution correspondante (100%DMSO) (μL)	V _{NaCl} 0,9 (m/v) (μL)	V _{DMSO} (μL)
1	20	/	/	1*	2	25	20	90	90
2	8	80	120	2*	0,8	10	20	90	90
3	4	40	160	/	/	/	/	/	/
4	0.8	40 μL de la solution 3	160	4*	0,08	1	20	90	90

12,5 µL de ces solutions (**1***, **2*** ou **4***) sont ajoutés à 100 µL de plasma humain, correspondant à des masses finales en **5n** de 25 µg, 10 µg et 1 µg pour 100 µL de plasma (concentration finale en DMSO de 6%). Chaque condition étant étudiée en duplicat. Ensuite, 5 µL d'une solution en étalon interne (**1o**) (2 mg.mL⁻¹ - 100% DMSO) et 300 µL d'acétonitrile sont ajoutés au mélange. Après 5 minutes de sonication, une centrifugation à 4°C à 1000 g pendant 10 minutes est réalisée. 250 µL de surnageant sont récoltés et évaporés sous flux d'azote (0,1 bar N₂ – 60°C) pendant 1 heure. Les résidus sont solubilisés dans l'éluant (200 µL) et une sonication de 10 minutes est réalisée. Après filtration sur une membrane possédant des pores de 0,2 µm de diamètre (Life Sciences, 0,2 µm GHP Acrodisc), 10 µL de solution sont analysés par HPLC sur une colonne Agilent Zorbax Eclipse XDB C8 (4,6 mm x 150 mm ; 5 µm) avec un éluant composé de butanesulfonate de sodium (0,01 M) dans un mélange méthanol : eau (70 : 30) au débit de 1,0 mL.min⁻¹. La mesure de l'absorbance à 254 nm au cours du temps d'élution permet de calculer les aires sous la courbe correspondant à l'élution de **5n** (temps de rétention de 9,1 minutes) et à l'élution de **1o** (temps de rétention de 6,7 minutes). Le rapport de ces aires sous la courbe, calculé selon l'Équation 4, est ensuite reporté en fonction de la masse en **5n** présente dans 100 µL de plasma, afin d'établir la droite de calibration.

$$r = \frac{ASC_{CM16}}{ASC_{CV21}} \quad \text{Équation 4}$$

Où r est le rapport des aires sous la courbe

ASC_{5n} est l'aire sous la courbe correspondant à l'élution de **5n** (temps de rétention de 9,1 minutes)

ASC_{1o} est l'aire sous la courbe correspondant à l'élution de **1o** (temps de rétention de 6,7 minutes)

Test de stabilité plasmatique

12,5 µL d'une solution de **5n** 2 mg.mL⁻¹ (soit 25 µg) dans 55% DMSO-45% NaCl 0,9 (m/v) (solution **1***) sont ajoutés sur 100 µL de plasma humain. Les échantillons, réalisés en triplicat, sont ensuite incubés à 37°C et 500 rpm pour des temps de 0-0,25-0,5-1-2-4-8 heures. Après incubation, les échantillons sont récupérés afin de réaliser le dosage de **5n** dans le plasma selon le protocole décrit ci-dessus. Le rapport des aires sous la courbe correspondant aux élution de **5n** et **1o** sont calculés pour chaque échantillon selon l'Équation 4. L'utilisation de la droite de calibration permet ainsi de calculer la masse en **5n** présente dans le plasma après différents temps d'incubation.

Il est à noter que ce protocole permet une récupération de **5n** présent dans le plasma de 76,6±6,1%, comparé au même protocole réalisé dans le tampon phosphate (pH 7,4), et non dans le plasma.

➤ Étude du mode d'action des molécules

3.7. Évaluation du pouvoir intercalant de l'ADN

L'étude du pouvoir intercalant de l'ADN des composés étudiés est réalisée sur de l'ADN issu de thymus de veau (Sigma-Aldrich). Celui-ci a été solubilisé, pour une concentration de 2 mg.mL^{-1} , par agitation à 4°C pendant 12 heures, dans un tampon Tris 10 mM – EDTA 1mM au pH 7,4. La détermination de la concentration en ADN (M) se fait par un spectromètre mesurant l'absorbance à 260 nm (Nanodrop 2000). En effet, la concentration en ADN est reliée à l'absorbance par la loi de Lambert-Beer (**Équation 5**).

$$A = \varepsilon . l . C \quad \text{Équation 5}$$

Où A est l'absorbance mesurée (U.A.)

ε est le coefficient d'extinction molaire de l'ADN double brin ($6600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

l est la largeur de la colonne de liquide (cm)

C est la concentration en ADN (M)

A partir d'une solution stock en ADN de 2 mg.mL^{-1} dans du tampon Tris 10 mM – EDTA 1mM au pH 7,4 et des solutions stock en doxorubicine (composé de référence - $1,25 \text{ mM}$ – 100% DMSO) et des différents dérivés de l'harminé étudiés ($2,5 \text{ mM}$ – 100% DMSO), plusieurs conditions ont été réalisées (**Tableau 25**).

Tableau 25: Concentrations des différents éléments permettant de déterminer la température de fusion de l'ADN en présence de doxorubicine ou de dérivés de l'harminé.

	[ADN] (μM)	[composé] (μM)	Rapport ADN : composé	% Tampon pH 7,4	% DMSO
Contrôle	50	/	/	99	1
Doxorubicine	50	12,5	1 : 4	99	1
Dérivés de l'harminé	50	25	1 : 2	99	1

Pour chaque condition étudiée et réalisée en duplicat, la variation de l'absorbance à 260 nm (absorbance des acides nucléiques) est mesurée sur une gamme de température allant de 25°C à 95°C suivant un gradient de 0,5 °C.min⁻¹. La température de fusion de l'ADN, correspondant à la température pour laquelle 50% des molécules sont sous forme de simples brins, est déterminée en absence et en présence du composé étudié. La différence de température de fusion de l'ADN est calculée selon l'**Équation 6**.

$$\Delta T_M = T_{M \text{ (ADN + composé)}} - T_{M \text{ (ADN)}} \quad \text{Équation 6}$$

Où ΔT_M est la différence de température de fusion de l'ADN

$T_{M \text{ (ADN + composé)}}$ est la température de fusion de l'ADN en présence du composé étudié

$T_{M \text{ (ADN)}}$ est la température de fusion de l'ADN seul

4. ÉTUDE *IN VIVO*

4.1. Évaluation de la dose maximale tolérée

L'expérience permettant de définir la dose maximale tolérée de **5n** a été réalisée sur des souris femelles saines CD1 de 6 semaines, pesant entre 28 g et 32 g et provenant du laboratoire Charles River (L'Arbresle, France). Les souris ont été hébergées dans une pièce dont la température était de 23±3°C, avec un taux d'humidité de 45% à 65% et un cycle de lumière de 12 heures par jour a été mis en place. Les animaux avaient un accès libre à la nourriture et à l'eau du robinet.

Chaque dose (1 mg.kg⁻¹ et 5 mg.kg⁻¹) a été étudiée sur un groupe de 6 souris. Les injectables ont été préparés par broyage manuel de la poudre, suivi de l'addition de 99,9% NaCl 0,9 (m/v) et 0,01% Tween-80 pour des concentrations de 0,2 mg.mL⁻¹ et 1 mg.mL⁻¹ respectivement. La suspension a été soumise à la sonication pendant 10 minutes, avant administration intrapéritonéale. Chaque animal a été observé (masse, comportement) pendant les 28 jours suivant l'administration du **5n**. Au terme de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés par inhalation d'IsoFlo®. Les organes ont été prélevés et conservés dans du formol 10% afin de réaliser une analyse histopathologique. L'expérience a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Namur (Belgique) (protocole n° 13198 DO – Maître d'expérience : Dr. Julie Laloy).

4.2. Évaluation de l'effet anticancéreux de 5n

L'expérience permettant de définir le pouvoir anticancéreux de **5n** a été réalisée sur des souris femelles C57/BL6 de 6 semaines pesant entre 15 g et 20 g et provenant du laboratoire Charles River (L'Arbresle, France). Les souris ont été hébergées dans une pièce dont la température était de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, avec un taux d'humidité de 24% à 64% et un cycle de lumière de 12 heures par jour a été mis en place. Les animaux avaient un accès libre à la nourriture et à l'eau du robinet.

L'effet anticancéreux de **5n** a été évalué sur un modèle murin présentant des métastases pulmonaires. Ce modèle a été obtenu par injection de 200 μL de milieu RPMI contenant 250 000 cellules de mélanomes murins B16F10 (fournies par l'équipe du Pr. Véronique Mathieu, ULB), dans la veine caudale. Cinq jours après l'injection des cellules, les animaux ont été divisés en trois groupes (13 animaux par groupe) comprenant un groupe traité par le témozolomide, composé de référence, un groupe traité par le **5n** et un groupe traité par l'excipient (groupe contrôle).

Le témozolomide a été choisi comme composé de référence. En effet, ce composé possède une activité anticancéreuse sur le modèle murin choisi, en augmentant significativement le temps de survie des animaux[122,123]. Une solution de 4 mg.mL^{-1} en témozolomide et en L-Histidine a été préparée dans un tampon phosphate (pH 5) conforme à la pharmacopée européenne. Les solutions ont été préparées pour une semaine et stockées à 4°C . Les animaux ont été traités trois fois par semaine pendant trois semaines par une administration orale de témozolomide (80 mg.kg^{-1}).

Une suspension de 0,05 mg.mL^{-1} en **5n** a été obtenue par ajout de 99,9% NaCl 0,9 (m/v) et 0,01% Tween-80 sur la poudre de **5n** broyée au préalable. La suspension a été soumise à 10 minutes de sonication. Les animaux ont été traités une fois par semaine pendant trois semaines par une administration intrapéritonéale de **5n** (1 mg.kg^{-1}).

Le groupe contrôle a été traité par administration intrapéritonéale de l'excipient seul (99,9% NaCl 0,9 (m/v) et 0,01% Tween-80), une fois par semaine pendant trois semaines.

Cette expérience a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Namur (Belgique) (protocole n° 14208 DO - Maître d'expérience : Dr. Julie Laloy).

4.3. Évaluation de la pharmacocinétique du composé 5n

L'expérience permettant de définir la pharmacocinétique de **5n** a été réalisée sur des souris femelles saines CD1 de 6 semaines, pesant entre 25 g et 31 g et provenant du laboratoire Charles River (L'Arbresle, France). Les souris ont été hébergées dans une pièce dont la température était de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, avec un taux d'humidité de 37% à 63% et un cycle de lumière de 12 heures par jour a été mis en place. Les animaux avaient un accès libre à la nourriture et à l'eau du robinet.

La suspension administrée a été préparée par broyage manuel de la poudre de **5n**, suivi de l'addition de 99,9% NaCl 0,9 (m/v) et 0,01% Tween-80, pour une concentration 1 mg.mL^{-1} . La suspension a été soumise à la sonication pendant 10 minutes. Une dose de 5 mg.kg^{-1} a été administrée par voie IP à 21 souris (3 souris par groupe). Différents temps après administration IP (0h – 1h – 2h – 4h – 8h – 12h – 24h) les animaux ont été sacrifiés par inhalation d'IsoFlo® et le sang a été prélevé sur tube hépariné. Le plasma murin a été récupéré après centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes. Le dosage plasmatique décrit au point 3.6., légèrement modifié, a ensuite été utilisé afin d'évaluer la concentration en composé **5n**. Après évaporation des échantillons sous flux d'azote (0,1 bar N_2 – 60°C) pendant 1 heure, les résidus ont été solubilisés dans 110 μL de DMSO et une sonication de 10 minutes a été réalisée. 100 μL de chaque échantillon ont été récupérés et placés dans une plaque 96-puits noire. La fluorescence des échantillons a ensuite été mesurée ($\lambda_{\text{excitation}}=340\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=440\text{nm}$) et comparée à une droite de calibration.

Cette expérience a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Namur (Belgique) (protocole n° 14207 DO - Maître d'expérience : Dr. Julie Laloy).

- [1] G.A. Gross, R.J. Turesky, L.B. Fay, W.G. Stillwell, P.L. Skipper, S.R. Tannenbaum, Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings, *Carcinogenesis*. 14 (1993) 2313–18.
- [2] W. Pfau, K. Skog, Exposure to beta-carbolines norharman and harman., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 802 (2004) 115–26.
- [3] Y. Totsuka, H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Quantification of the co-mutagenic β -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods, *Cancer Lett.* 143 (1999) 139–43.
- [4] W. Zheng, S. Wang, L.F. Barnes, Y. Guan, E.D. Louis, Determination of harmane and harmine in human blood using reversed-phased high-performance liquid chromatography and fluorescence detection, *Anal. Biochem.* 279 (2000) 125–9.
- [5] D.J. McKenna, G.H.N. Towers, F. Abbott, Monoamine oxidase inhibitors in south american hallucinogenic plants: tryptamine and β -carboline constituents of ayahuasca, *J. Ethnopharmacol.* 10 (1984) 195–223.
- [6] R. Cao, Q. Chen, X. Hou, H. Chen, H. Guan, Y. Ma, W. Peng, A. Xu, Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted β -carboline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 4613–23.
- [7] J.M. Pérez Martín, V. Labrador, P. Fernández Freire, M.L. Molero, M.J. Hazen, Ultrastructural changes induced in HeLa Cells after phototoxic treatment with harmine, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 197–201.
- [8] Y. Song, D. Kesuma, J. Wang, Y. Deng, J. Duan, J.H. Wang, R.Z. Qi, Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317 (2004) 128–32.
- [9] T.P. Hamsa, G. Kuttan, Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma., *Chin. Med.* 6 (2011) 1–8.
- [10] R. Frédérick, C. Bruyère, C. Vancraeynest, J. Reniers, C. Meinguet, L. Pochet, A. Backlund, B. Masereel, R. Kiss, J. Wouters, Novel trisubstituted harmine derivatives with original in vitro anticancer activity, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6489–501.
- [11] H. Liu, D. Han, Y. Liu, X. Hou, J. Wu, H. Li, J. Yang, C. Shen, G. Yang, C. Fu, X. Li, H. Che, J. Ai, S. Zhao, Harmine hydrochloride inhibits Akt phosphorylation and depletes the pool of cancer stem-like cells of glioblastoma, *J. Neurooncol.* 112 (2013) 39–48.
- [12] L. Zhao, M. Wink, The β -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype, *PeerJ*. 1 (2013) e174.
- [13] H. Zhang, K. Sun, J. Ding, H. Xu, L. Zhu, K. Zhang, X. Li, W. Sun, Harmine induces apoptosis and inhibits tumor cell proliferation, migration and invasion through down-regulation of cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer, *Phytomedicine*. 21 (2014) 1–8.

- [14] M.R. Cao, Q. Li, Z.L. Liu, H.H. Liu, W. Wang, X.L. Liao, Y.L. Pan, J.W. Jiang, Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 10 (2011) 599–604.
- [15] Q. Chen, R. Chao, H. Chen, X. Hou, H. Yan, S. Zhou, W. Peng, A. Xu, Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis., *Int. J. Cancer.* 114 (2004) 675–82.
- [16] F. Dai, Y. Chen, Y. Song, L. Huang, D. Zhai, Y. Dong, L. Lai, T. Zhang, D. Li, X. Pang, M. Liu, Z. Yi, A natural small molecule harmine inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth through activation of p53 in endothelial cells, *PLoS One.* 7 (2012) e52162.
- [17] T.P. Hamsa, G. Kuttan, Studies on Anti-metastatic and Anti-invasive Effects of Harmine Using Highly Metastatic Murine B16F-10 Melanoma Cells, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 30 (2011) 123–137.
- [18] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell.* 144 (2011) 646–74.
- [19] P. May, E. May, Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein, *Oncogene.* 18 (1999) 7621–36.
- [20] M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut, TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) 1–17.
- [21] N. Rivlin, R. Brosh, M. Oren, V. Rotter, Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis, *Genes Cancer.* 2 (2011) 466–74.
- [22] R. Lacave, C.-J. Larsen, J. Robert, *Cancérologie fondamentale*, John Libbey, 2005.
- [23] J.G. Teodoro, S.K. Evans, M.R. Green, Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome, *J. Mol. Med.* 85 (2007) 1175–86.
- [24] R. Nishikawa, X.D. Ji, R.C. Harmon, C.S. Lazar, G.N. Gill, W.K. Cavenee, H.J. Huang, A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 7727–31.
- [25] H.-W. Lo, EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance, *Curr. Mol. Pharmacol.* 3 (2010) 37–52.
- [26] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J.S.C. Arthur, D.R. Alessi, P. Cohen, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, *Biochem. J.* 408 (2007) 297–315.
- [27] N. Göckler, G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F.J. Tejedor, W. Becker, Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation, *FEBS J.* 276 (2009) 6324–37.
- [28] T. Adayev, J. Wegiel, Y.-W. Hwang, Harmine is an ATP-competitive inhibitor for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 212–8.

- [29] S.R. Ferron, N. Pozo, A. Laguna, S. Aranda, E. Porlan, M. Moreno, C. Fillat, S. De La Luna, P. Sánchez, M.L. Arbonés, I. Fariñas, Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling, *Cell Stem Cell*. 7 (2010) 367–379.
- [30] N. Pozo, C. Zahonero, P. Fernández, J.M. Liñares, A. Ayuso, M. Hagiwara, A. Pérez, J.R. Ricoy, A. Hernández-Laín, J.M. Sepúlveda, P. Sánchez-Gómez, Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 2475–87.
- [31] A. Soeda, A. Inagaki, N. Oka, Y. Ikegame, H. Aoki, S.I. Yoshimura, S. Nakashima, T. Kunisada, T. Iwama, Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 10958–66.
- [32] G. Karpel-Massler, U. Schmidt, A. Unterberg, M.-E. Halatsch, Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand?, *Mol. Cancer Res.* 7 (2009) 1000–12.
- [33] T.P. Hamsa, G. Kuttan, Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro, *Eur. J. Pharmacol.* 649 (2010) 64–73.
- [34] A.M. Sobhani, S.-A. Ebrahimi, M. Mahmoudian, An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by Peganum harmala L. seeds extract and its β -carboline alkaloids, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 5 (2002) 19–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042115>.
- [35] R. Cao, W. Peng, H. Chen, Y. Ma, X. Liu, X. Hou, H. Guan, A. Xu, DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 1557–63.
- [36] A.T. Annunziato, Inhibitors of topoisomerases I and II arrest DNA replication, but do not prevent nucleosome assembly in vivo, *J. Cell Sci.* 93 (1989) 593–603.
- [37] I. Collins, A. Weber, D. Levens, Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 8437–51.
- [38] X. Huang, F. Traganos, DNA damage induced by DNA topoisomerase I- and topoisomerase II-Inhibitors detected by histone H2AX phosphorylation in relation to the cell cycle phase and apoptosis, *Cell Cycle*. 2 (2003) 613–18.
- [39] N. Tamura, K. Hirano, K. Kishino, K. Hashimoto, O. Amano, J. Shimada, H. Sakagami, Analysis of type of cell death induced by topoisomerase inhibitor SN-38 in human oral squamous cell carcinoma cell lines, *Anticancer Res.* 32 (2012) 4823–32.
- [40] Y.F. Sasaki, H. Yamada, K. Shimoi, N. Kinae, I. Tomita, H. Matsumura, T. Ohta, Y. Shirasu, Enhancing effect of heterocyclic amines and β -carbolines on the induction of chromosome aberrations in cultured mammalian cells, *Mutat. Res.* 269 (1992) 79–95.
- [41] M. Vignoni, R. Erra-Balsells, B. Epe, F.M. Cabrerizo, Intra- and extra-cellular DNA damage by harmine and 9-methyl-harmine, *J. Photochem. Photobiol. B.* 132 (2014) 66–71.
- [42] S. Nafisi, M. Bonsaii, P. Maali, M.A. Khalilzadeh, F. Manouchehri, β -carboline alkaloids bind DNA, *J. Photochem. Photobiol. B.* 100 (2010) 84–91.

- [43] Y. Song, J. Wang, S.F. Teng, D. Kesuma, Y. Deng, J. Duan, J.H. Wang, R.Z. Qi, M.M. Sim, β -Carbolines as specific inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12 (2002) 1129–11.
- [44] S.A. Rosenberg, IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer, *J. Immunol.* 192 (2015) 5451–8.
- [45] Répertoire commenté des médicaments, (2014). <http://www.cbip.be> (accessed January 30, 2014).
- [46] E.P. Chen, E.M. Smyth, COX-2 and PGE2-dependent immunomodulation in breast cancer, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96 (2011) 14–20.
- [47] C. Göbel, F. Breitenbuecher, H. Kalkavan, P.S. Hähnel, S. Kasper, S. Hoffarth, K. Merches, H. Schild, K.S. Lang, M. Schuler, Functional expression cloning identifies COX-2 as a suppressor of antigen-specific cancer immunity, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1568.
- [48] A. Persidis, Cancer multidrug resistance., *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 94–95.
- [49] Y. Ma, M. Wink, The β -carboline alkaloid harmine inhibits BCRP and can reverse resistance to the anticancer drugs Mitoxantrone and Camptothecin in breast cancer cells, *Phyther. Res.* 149 (2010) 146–49.
- [50] S.Y. Eid, M.Z. El-Readi, M. Wink, Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells, *Phytomedicine.* 19 (2012) 1288–97.
- [51] S.Y. Eid, M.Z. El-Readi, E.E.M.N. Eldin, S.H. Fatani, M. Wink, Influence of combinations of digitonin with selected phenolics, terpenoids, and alkaloids on the expression and activity of P-glycoprotein in leukaemia and colon cancer cells, *Phytomedicine.* 21 (2013) 47–61.
- [52] M.M. Airaksinen, A. Lecklin, V. Saano, L. Tuomisto, J. Gynther, Tremorigenic effect and inhibition of tryptamine and serotonin receptor binding by β -carbolines, *Pharmacol. Toxicol.* 60 (1987) 5–8.
- [53] R. Cao, H. Chen, W. Peng, Y. Ma, X. Hou, H. Guan, X. Liu, A. Xu, Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel beta-carboline derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 991–1001.
- [54] J.M. Boeira, J. da Silva, B. Erdtmann, J.A. Henriques, Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro, *Pharmacol. Toxicol.* 89 (2001) 287–94.
- [55] J.N. Picada, K.V.C.L. da Silva, B. Erdtmann, A.T. Henriques, J.A.P. Henriques, Genotoxic effects of structurally related β -carboline alkaloids, *Mutat. Res.* 379 (1997) 135–49.
- [56] J. Ishida, H.-K. Wang, K.F. Bastow, C.-Q. Hu, K.-H. Lee, Antitumor agents 201. Cytotoxicity of harmine and β -carboline analogs, *Bioorg. Med. Chem.* 9 (1999) 3319–24.
- [57] T.A.K. Al-allaf, L.J. Rashan, Synthesis and cytotoxic evaluation of the first trans-palladium (II) complex with naturally occurring alkaloid harmine, *Eur. J. Med. Chem.* 33 (1998) 817–20.

- [58] R. Cao, X. Guan, B. Shi, Z. Chen, Z. Ren, W. Peng, H. Song, Design, synthesis and 3D-QSAR of β -carboline derivatives as potent antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 2503–15.
- [59] W. Luo, J. Liu, J. Li, D. Zhang, M. Liu, J.K. Addo, S. Patil, L. Zhang, J. Yu, J.K. Buolamwini, J. Chen, C. Huang, Anti-cancer effects of JKA97 are associated with its induction of cell apoptosis via a Bax-dependent and p53-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 8624–33.
- [60] X. Yang, W. Wang, J.-J. Qin, M.-H. Wang, H. Sharma, J.K. Buolamwini, H. Wang, R. Zhang, JKA97, a novel benzylidene analog of harmine, exerts anti-cancer effects by inducing G1 arrest, apoptosis, and p53-independent up-regulation of p21, *PLoS One.* 7 (2012) e34303.
- [61] P.C. Kuo, L.S. Shi, A.G. Damu, C.R. Su, C.H. Huang, C.H. Ke, J. Bin Wu, A.J. Lin, K.F. Bastow, K.H. Lee, T.S. Wu, Cytotoxic and Antimalarial β -Carboline Alkaloids from the Roots of *Eurycoma longifolia*, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 1324–27.
- [62] R. Cao, W. Yi, Q. Wu, X. Guan, M. Feng, C. Ma, Z. Chen, H. Song, W. Peng, Synthesis and cytotoxic activities of 1-benzylidene substituted β -carboline derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 6558–61.
- [63] R. Cao, W. Fan, L. Guo, Q. Ma, G. Zhang, J. Li, X. Chen, Z. Ren, L. Qiu, Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 135–43.
- [64] G. Zhang, R. Cao, L. Guo, Q. Ma, W. Fan, X. Chen, J. Li, G. Shao, L. Qiu, Z. Ren, Synthesis and structure-activity relationships of N^2 -alkylated quaternary β -carbolines as novel antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.* 65 (2013) 21–31.
- [65] X. Han, J. Zhang, L. Guo, R. Cao, Y. Li, N. Li, Q. Ma, J. Wu, Y. Wang, S. Si, A series of β -Carboline derivatives inhibit the kinase activity of PLKs, *PLoS One.* 7 (2012).
- [66] S. Li, A. Wang, F. Gu, Z. Wang, C. Tian, Z. Qian, L. Tang, Y. Gu, Novel harmine derivatives for tumor targeted therapy, *Oncotarget.* 6 (2015) 8988–9001.
- [67] I. Filali, J. Bouajila, M. Znati, F. Bousejra-El Garah, H. Ben Jannet, Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (2014) 1–6.
- [68] B. Shi, R. Cao, W. Fan, L. Guo, Q. Ma, X. Chen, G. Zhang, L. Qiu, H. Song, Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel bivalent β -carbolines, *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 10–22.
- [69] J.J. Fortunato, G.Z. Réus, T.R. Kirsch, R.B. Stringari, G.R. Fries, F. Kapczinski, J.E. Hallak, A.W. Zuardi, J.A. Crippa, J. Quevedo, Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus, *J. Neural Transm.* 117 (2010) 1131–7.
- [70] J.J. Fortunato, G.Z. Réus, T.R. Kirsch, R.B. Stringari, G.R. Fries, F. Kapczinski, J.E. Hallak, A.W. Zuardi, J.A. Crippa, J. Quevedo, Effects of β -carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: Further evidence of antidepressant properties, *Brain Res. Bull.* 81 (2010) 491–96.

- [71] D. Farzin, N. Mansouri, Antidepressant-like effect of harmine and other β -carbolines in the mouse forced swim test, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 16 (2006) 324–28.
- [72] J. Wegiel, C.-X. Gong, Y.-W. Hwang, The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases, *FEBS J.* 278 (2011) 236–45.
- [73] B. Grella, M. Dukat, R. Young, M. Teitler, K. Herrick-Davis, C.B. Gauthier, R.A. Glennon, Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines, *Drug Alcohol Depend.* 50 (1998) 99–107.
- [74] R.A. Glennon, M. Dukat, B. Grella, S. Hong, L. Costantino, M. Teitler, C. Smith, C. Egan, K. Davis, M. V Mattson, Binding of β -carbolines and related agents at serotonin (5-HT(2) and 5-HT(1A)), dopamine (D(2)) and benzodiazepine receptors, *Drug Alcohol Depend.* 60 (2000) 121–32.
- [75] S.M. Husbands, R.A. Glennon, S. Gorgerat, R. Gough, R. Tyacke, J. Crosby, D.J. Nutt, J.W. Lewis, A.L. Hudson, β -carboline binding to imidazoline receptors, *Drug Alcohol Depend.* 64 (2001) 203–8.
- [76] H. Waki, K.W. Park, N. Mitro, L. Pei, R. Damoiseaux, D.C. Wilpitz, K. Reue, E. Saez, P. Tontonoz, The Small Molecule Harmine Is an Antidiabetic Cell-Type-Specific Regulator of PPAR γ Expression, *Cell Metab.* 5 (2007) 357–370.
- [77] Y. Yamazaki, Y. Kawano, Inhibitory effects of herbal alkaloids on the tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 59 (2011) 388–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372424>.
- [78] E.S. Hara, M. Ono, S. Kubota, W. Sonoyama, Y. Oida, T. Hattori, T. Nishida, T. Furumatsu, T. Ozaki, M. Takigawa, T. Kuboki, Novel chondrogenic and chondroprotective effects of the natural compound harmine, *Biochimie.* 95 (2013) 374–81.
- [79] D. Shahinas, M. Liang, A. Datti, D.R. Pillai, A repurposing strategy identifies novel synergistic inhibitors of Plasmodium falciparum heat shock protein 90, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 3552–7.
- [80] D. Shahinas, G. Macmullin, C. Benedict, D.R. Pillai, I. Crandall, Harmine is a potent antimalarial targeting Hsp90 and synergizes with chloroquine and artemisinin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012) 1207–13.
- [81] S. Lala, S. Pramanick, S. Mukhopadhyay, S. Bandyopadhyay, M.K. Basu, Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems, *J. Drug Target.* 12 (2004) 165–75.
- [82] N. Bouayad, K. Rharrabe, M. Lamhamdi, N.G. Nourouti, F. Sayah, Dietary effects of harmine, a β -carboline alkaloid, on development, energy reserves and α -amylase activity of Plodia interpunctella Hubner (Lepidoptera: Pyralidae), *Saudi J. Biol. Sci.* 19 (2012) 73–80.
- [83] M.L. Alomar, F.A.O. Rasse-Suriani, A. Ganuza, V.M. C  ceres, F.M. Cabrerizo, S.O. Angel, In vitro evaluation of β -carboline alkaloids as potential anti-Toxoplasma agents, *BMC Res. Notes.* 6 (2013) 193.
- [84] R. Millet, Mast  re en Drug Design, in: Les Neurotransmetteurs, Institut de chimie pharmaceutique Albert Lespagnol, Lille, France, 2012.

- [85] J.M. Luque, S.W. Kwan, C.W. Abell, M. Da Prada, J.G. Richards, Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 363 (1995) 665–80.
- [86] J.W. Jahng, T.A. Houpt, T.C. Wessel, K. Chen, J. Shih, T. Joh, Localization of Monoamine Oxidase A and B mRNA in the Rat Brain by in situ hybridization, *Synapse.* 36 (1997) 30–6.
- [87] J.C. Shih, K. Chen, M.J. Ridd, Monoamine oxidase: from genes to behavior, *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 197–217.
- [88] C. Cusin, A. Serretti, E. Lattuada, R. Lilli, C. Lorenzi, E. Smeraldi, Association study of MAO-A, COMT, 5-HT2A, DRD2, and DRD4 polymorphisms with illness time course in mood disorders, *Am. J. Med. Genet.* 114 (2002) 380–90.
- [89] P. Gareri, U. Falconi, P. De Fazio, G. De Sarro, Conventional and new antidepressant drugs in the elderly, *Prog. Neurobiol.* 61 (2000) 353–96.
- [90] J. Reniers, Rational design, synthesis, molecular modeling and evaluation of β -carboline and 5H-indeno[1,2-c] pyridazin-5-one derivatives as potential MAO and IDO inhibitors, Thèse de doctorat, Université de Namur, Namur, Belgium, 2011.
- [91] J. Reniers, S. Robert, R. Frederick, B. Masereel, S. Vincent, J. Wouters, Synthesis and evaluation of β -carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 134–44.
- [92] S.-Y. Son, J. Ma, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita, T. Tsukihara, Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 5739–44.
- [93] Organisation mondiale de la santé, Cancer, (2015). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> (accessed May 11, 2015).
- [94] A. Rajasekaran, P.P. Thampi, Synthesis and antinociceptive activity of some substituted-5-[2-(1,2,3,4-tetrahydrocarbazol-9-yl)ethyl]tetrazol-1-ylalkanones, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 1359–64.
- [95] W.G. Finnegan, R.A. Henry, R. Lofquist, An improved synthesis of 5-substituted tetrazoles, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 3908–11.
- [96] C.H. Heathcock, R. Ratcliffe, A Stereoselective Total Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 1746–57.
- [97] E.H. Kerns, L. Di, Drug-like properties: concept, structure design and methods from ADME to toxicity optimization, Academic P, 2008.
- [98] Cancer Research UK, Cancer Statistics Report, *Lancet.* (2014) 1–10. <http://publications.cancerresearchuk.org/cancerstats/statssurvival/survival.html> (accessed April 1, 2015).
- [99] L. Ingrassia, F. Lefranc, J. Dewelle, L. Pottier, V. Mathieu, S. Spiegl-Kreinecker, S. Sauvage, M. El Yazidi, M. Dehoux, W. Berger, E. Van Quaquebeke, R. Kiss, Structure-activity relationship

analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryl derivative) as potential anticancer agents, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1100–14.

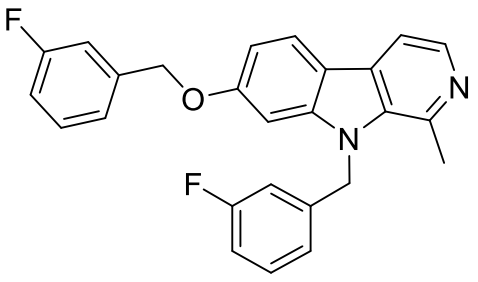
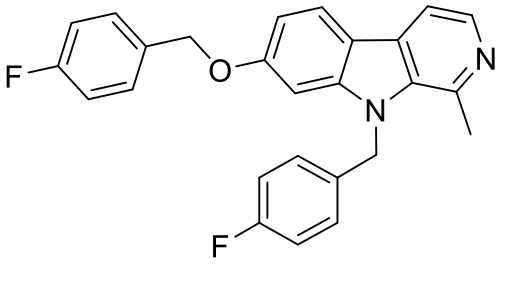
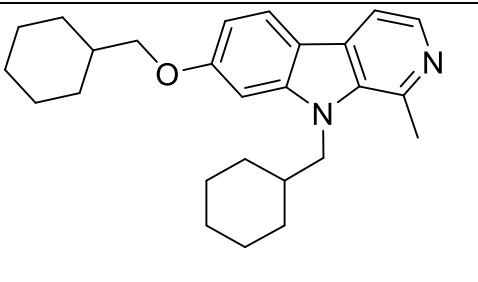
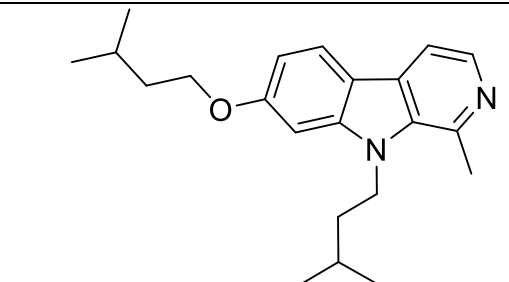
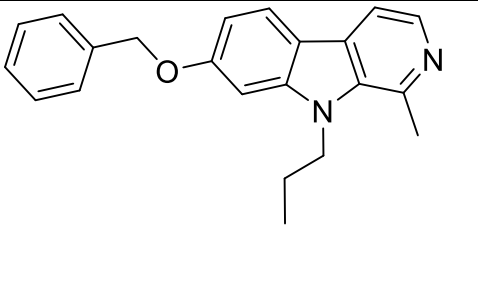
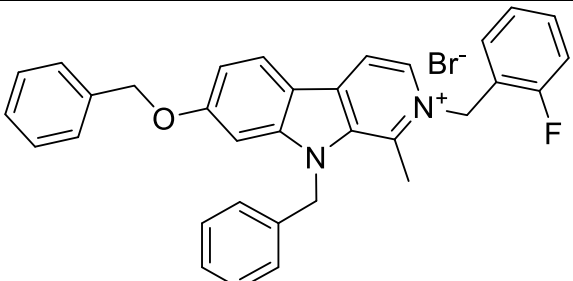
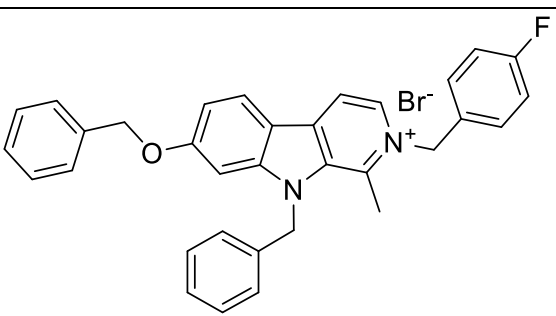
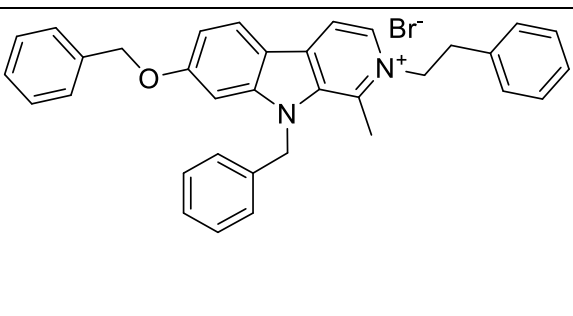
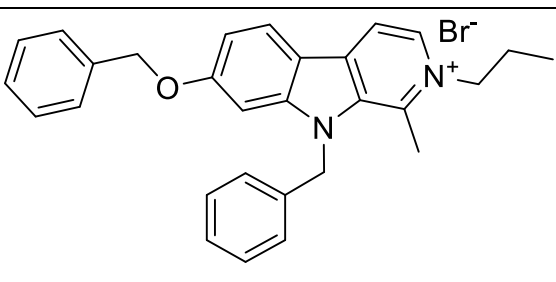
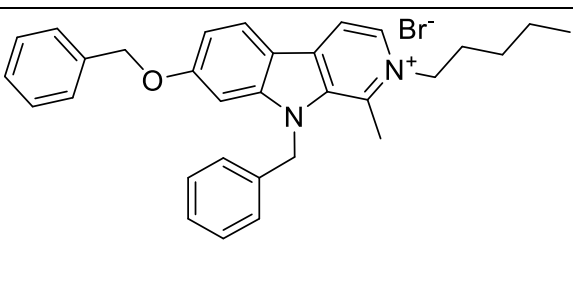
- [100] Sybyl 8.1; Tripos Inc. South Hanley Rd, St-Louis, MO, 63144, U.S., (n.d.).
- [101] Accelrys Software Inc., Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego, (2012). www.accelrys.com.
- [102] G. Wolber, A.A. Dornhofer, T. Langer, Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 20 (2006) 773–88.
- [103] M. Clark, R.D. Cramer, D.M. Jones, D.E. Patterson, P.E. Simeroth, Comparative molecular field analysis (CoMFA). 2. Toward its use with 3D-structural databases, *Tetrahedron Comput. Methodol.* 3 (1990) 47–59.
- [104] R. Frédérick, B. Masereel, J. Reniers, J. Wouters, C. Bruyère, R. Kiss, Brevet européen, WO2010EP59083, 2010.
- [105] R. Frédérick, B. Masereel, J. Reniers, J. Wouters, C. Bruyère, R. Kiss, Brevet US, US20100358609P, 2010.
- [106] Developmental therapeutic program NCI/NIH, (2015). <http://dtp.nci.nih.gov/index.html> (accessed January 1, 2015).
- [107] R. Palchaudhuri, P.J. Hergenrother, DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action., *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 497–503.
- [108] N. Juste, Etude du mode d'action de l'harimine et de ses dérivés en tant qu'agents intercalants de l'ADN, Université de Namur-Namur-Belgique, 2014.
- [109] K.D. Paull, R.H. Shoemaker, L. Hodes, A. Monks, D.A. Scudiero, L. Rubinstein, J. Plowman, M.R. Boyd, Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines: development of mean graph and COMPARE algorithm, *J. Natl. Cancer Inst.* 81 (1989) 1088–92.
- [110] S.L. Holbeck, Analysis of FDA-Approved anti-cancer agents in the NCI60 panel of human tumor cell lines, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2011) 1451–60.
- [111] Developmental Therapeutic Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, Rockville, MD, US., (n.d.). <http://dtp.cancer.gov>.
- [112] K.D. Paull, C.M. Lin, L. Malspeis, E. Hamel, Identification of novel antimitotic agents acting at the tubulin level by computer-assisted evaluation of differential cytotoxicity data, *Cancer Res.* 52 (1992) 3892–900.
- [113] D.W. Zaharevitz, R. Gussio, M. Leost, A.M. Senderowitz, T. Lahusen, C. Kunick, L. Meijer, E.A. Sausville, Discovery and initial characterisation of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Cancer Res.* 59 (1999) 2566–69.

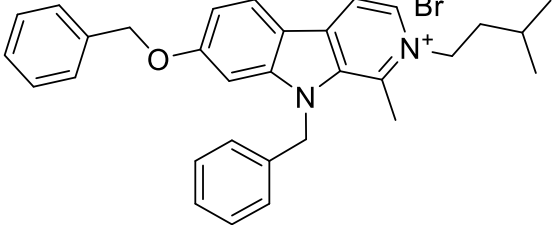
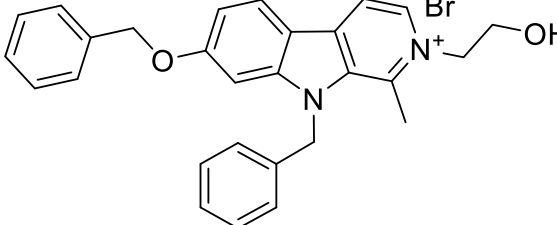
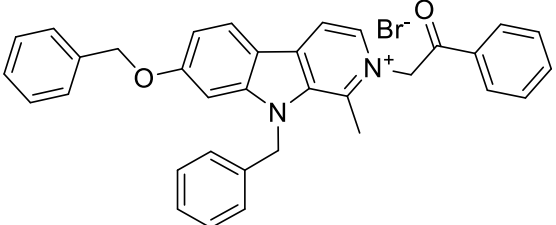
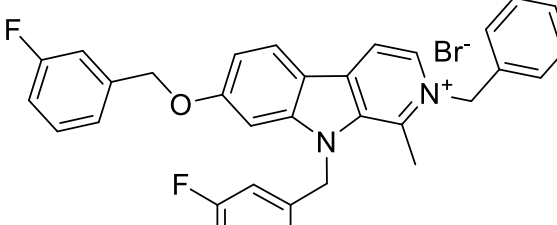
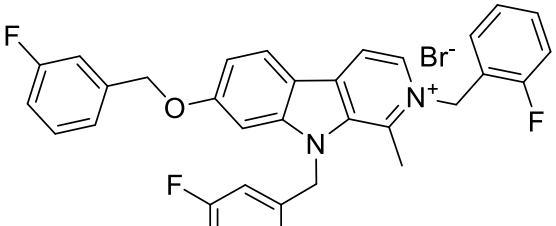
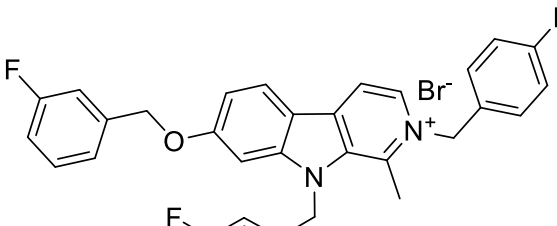
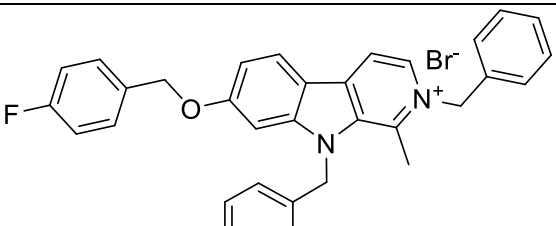
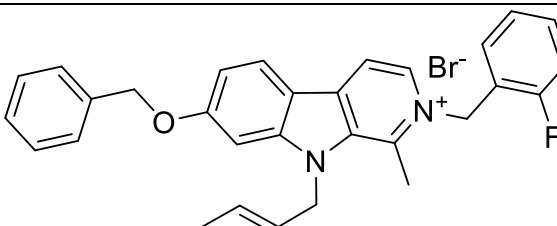
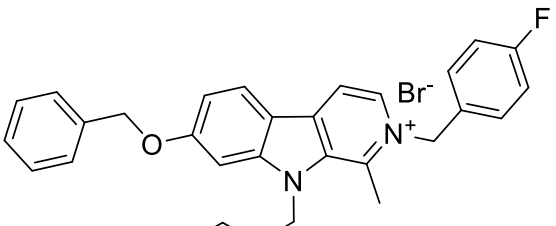
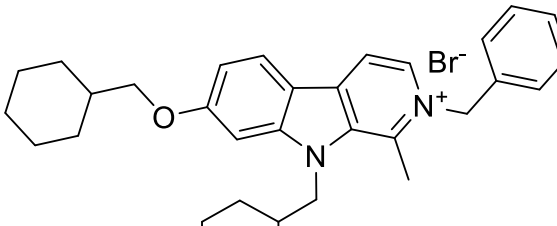
- [114] G. Kohlhausen, K.D. Paull, M. Cushman, P. Nagafuji, Y. Pommier, Protein-linked DNA strand breaks induced by NSC 314622, a novel noncamptothecin topoisomerase I poison, *Mol. Pharmacol.* 54 (1998) 50–8.
- [115] J. Chan, S.N. Khan, I. Harvey, W. Merrick, J. Pelletier, Eukaryotic protein synthesis inhibitors identified by comparison of cytotoxicity profiles, *RNA*. 10 (2004) 528–43.
- [116] H.C. Choi, P. Song, Z. Xie, Y. Wu, J. Xu, M. Zhang, Y. Dong, S. Wang, K. Lau, M.-H. Zou, Reactive nitrogen species is required for the activation of the AMP-activated protein kinase by statin in vivo, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 20186–97.
- [117] J. Trnka, F.H. Blaikie, A. Logan, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine, *Free Radic. Res.* 43 (2009) 4–12.
- [118] T. Satoh, Method for inhibiting neuronal cell death induced by oxidative glutamate toxicity, US 2008/0207765 A1, 2008.
- [119] S.R. Kimball, Eukaryotic initiation factor eIF2, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 25–9.
- [120] O. Lozano, J. Laloy, L. Alpan, J. Mejia, S. Rolin, O. Toussaint, J.M. Dogné, S. Lucas, B. Masereel, Effects of SiC nanoparticles orally administered in a rat model: Biodistribution, toxicity and elemental composition changes in feces and organs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 264 (2012) 232–45.
- [121] M. Mssassi, Etude des effets anti-cancéreux de molécules inhibitrices de la synthèse protéique pour combattre les cancers résistants à l'apoptose : Exemples des β -carboline . Par Mohsin Mssassi Année académique 2012-2013, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique, 2013.
- [122] N. Wauthoz, P. Deleuze, J. Hecq, I. Roland, S. Saussez, I. Adanja, O. Debeir, C. Decaestecker, V. Mathieu, R. Kiss, K. Amighi, In vivo assessment of temozolomide local delivery for lung cancer inhalation therapy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 39 (2010) 402–11.
- [123] V. Mathieu, M. Le Mercier, N. De Neve, S. Sauvage, T. Gras, I. Roland, F. Lefranc, R. Kiss, Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 2399–410.
- [124] J. Yokota, J. Yokota, Tumor progression and metastasis, *Carcinogenesis*. 21 (2000) 497–503.
- [125] A.R. Hedges, Industrial Applications of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2035–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848958>.
- [126] T. Loftsson, P. Jarho, M. Mar, T. Jarvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 335–51.
- [127] L. Martín, A. León, A.I. Olives, B. Del Castillo, M.A. Martín, Spectrofluorimetric determination of stoichiometry and association constants of the complexes of harmaline and harmine with β -cyclodextrin and chemically modified β -cyclodextrins, *Talanta*. 60 (2003) 493–503.
- [128] L. Martín, A. León, M.A. Martín, B. del Castillo, J.C. Menéndez, Detection and characterization of cyclodextrin complexes with β -carboline derivatives by spectroscopic techniques, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 991–1001.

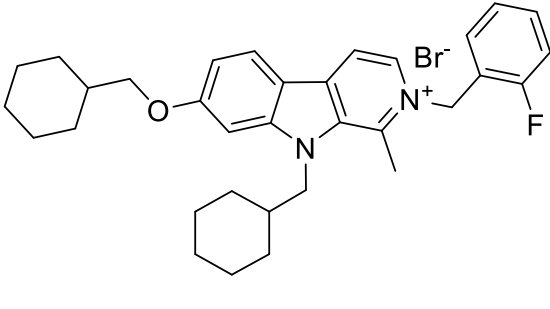
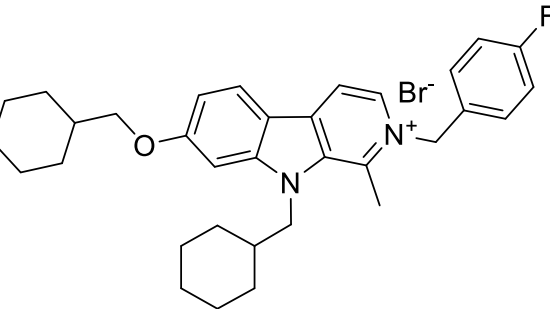
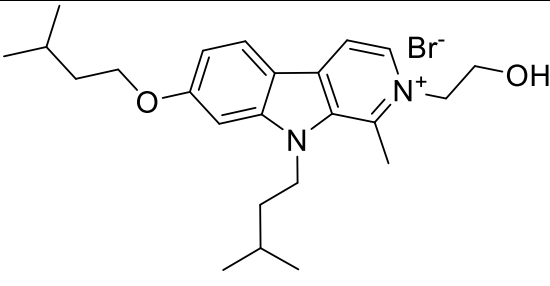
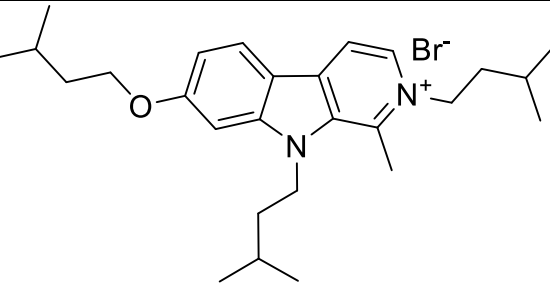
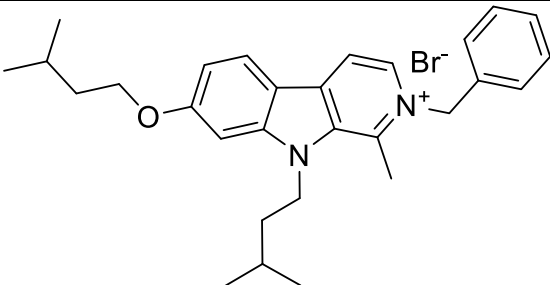
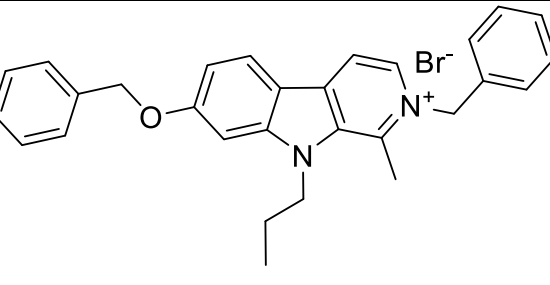
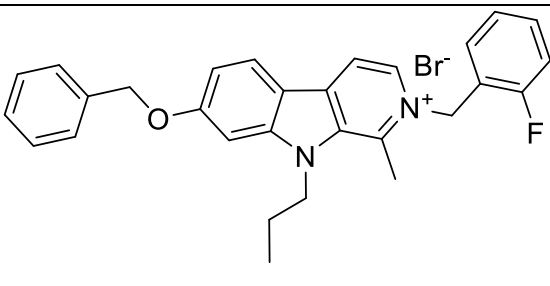
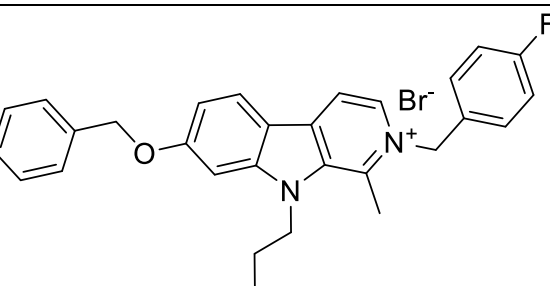
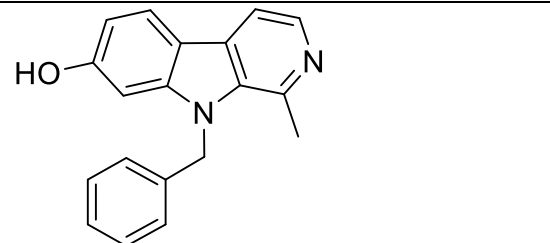
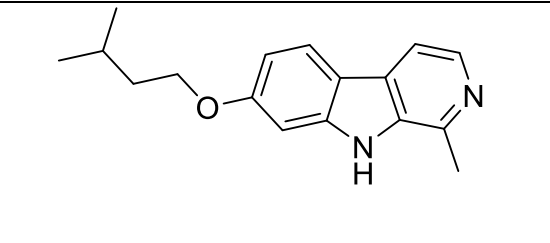
- [129] A. Mallick, B. Haldar, N. Chattopadhyay, Encapsulation of norharmane in cyclodextrin: formation of 1:1 and 1:2 inclusion complexes, *J. Photochem. Photobiol. B.* 78 (2005) 215–21.
- [130] T. Loftsson, M.E. Brewster, Cyclodextrins as Functional Excipients : Methods to Enhance Complexation Efficiency, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 10–12.
- [131] T. Higuchi, A.K. Connors, Phase solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4 (1965) 117–212.
- [132] T. Loftsson, M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development, *J. Pharm. Pharmacol.* 62 (2010) 1607–21.
- [133] T. Loftsson, D. Hreinsdóttir, M. Másson, Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs, *Int. J. Pharm.* 302 (2005) 18–28.
- [134] F. José, B. V Eiga, M.F. Ernandes, A.C. Arvalho, C. Frederico, G. Campos, G.C. Eraldes, Molecular modelling and ¹H-NMR : ultimate tools for the investigation of tolbutamide : β -cyclodextrin and tolbutamide : hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 49 (2001) 1251–6.
- [135] E. Spamer, D.G. Müller, P.L. Wessels, J.P. Venter, Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (2002) 247–53.
- [136] Accelrys Software Inc., Material Studio, Release 6.1, San Diego, (2012).
- [137] J. Guebel, Conception, synthèse et caractérisation physico-chimique et biologique de dérivés de l'harmane substitués par un groupement 4-méthylpyridine comme composés antiprolifératifs, Université de Namur-Namur-Belgique, 2015.
- [138] S. Marx, Conception, synthèse et caractérisation physico-chimique et biologique de dérivés de l'harmane substitués par un groupement 2-méthylpyridine comme composés antiprolifératifs, Université de Namur-Namur-Belgique, 2015.
- [139] ChemDraw Ultra 13, PerkinElmer Inc., Massachusetts, (2013), (n.d.). <http://www.cambridgesoft.com/>.
- [140] R.D. Cramer, J.D. Bunce, D.E. Patterson, Crossvalidation, Bootstrapping, and Partial Least Squares Compared with Multiple Regression in Conventional, *Quant. Struct. Relatsh.* 25 (1988) 18–25.
- [141] M. Neuwels, Mastère en Drug Design, in: Modélisation Moléculaire QSAR 3D, Institut de chimie pharmaceutique Albert Lespagnol, Lille, France, 2012.
- [142] F.H. Allen, The Cambridge Structural Database : a quarter of a million crystal structures and rising research papers, *Acta Crystallogr. Sect. B, Struct. Sci.* B58 (2002) 380–88.
- [143] M.R. Caira, E.J. de Vries, L.R. Nassimbeni, Crystallization of two forms of a cyclodextrin inclusion complex containing a common organic guest, *Chem. Commun.* 16 (2003) 2058–9.
- [144] Merck Millipore Corporation, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne, (n.d.).

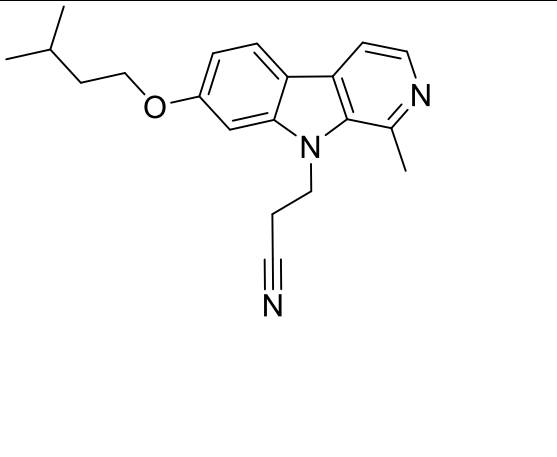
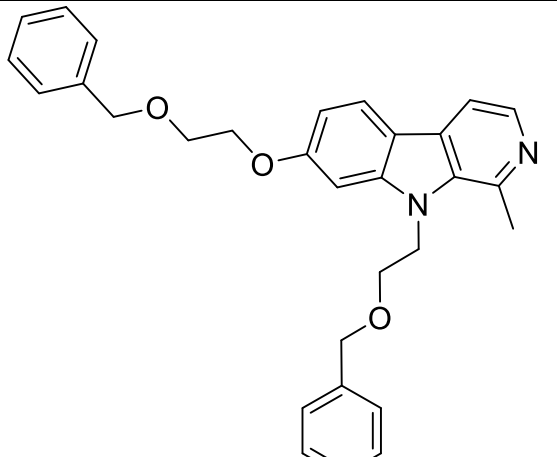
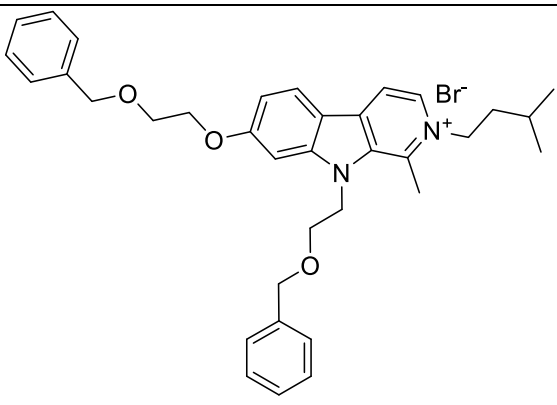
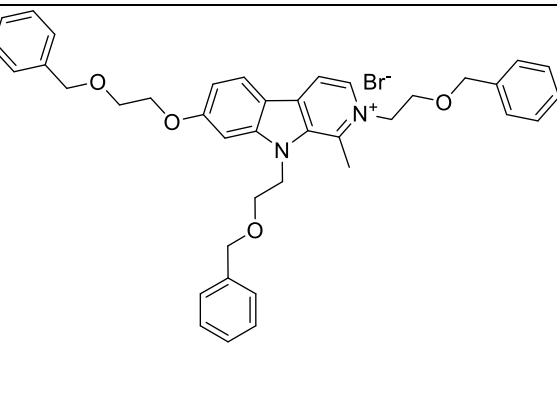
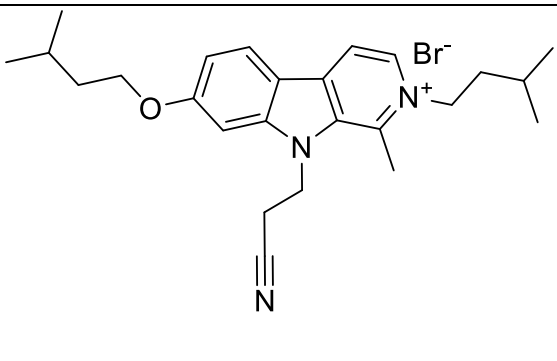
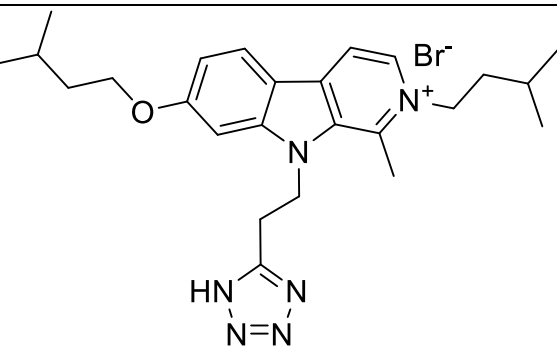
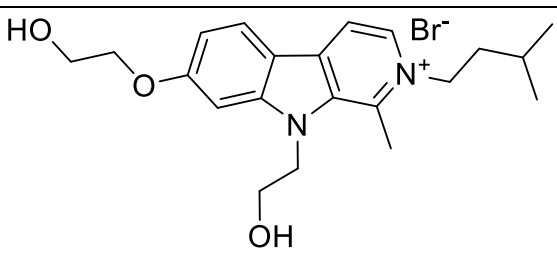
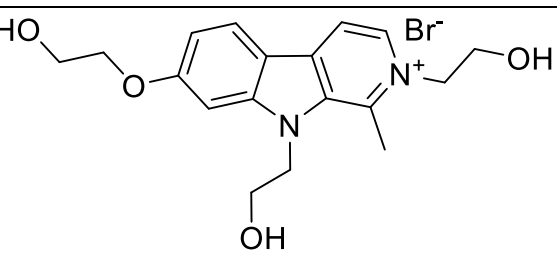
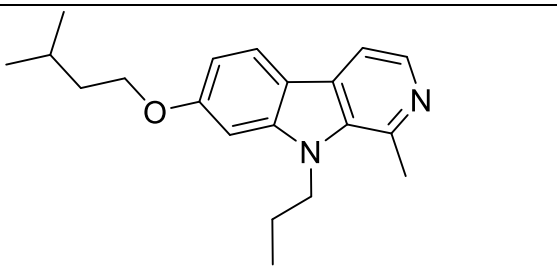
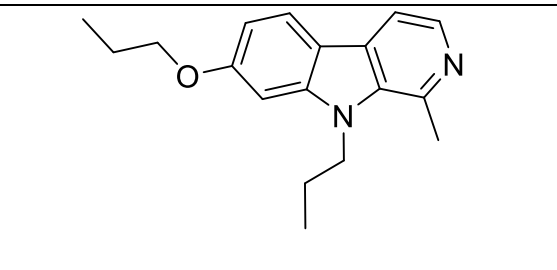
- [145] M.C. Wenlock, R.P. Austin, T. Potter, P. Barton, A highly automated assay for determining the aqueous equilibrium solubility of drug discovery compounds, *J. Lab. Autom.* 16 (2011) 276–84.
- [146] P. Dumont, L. Ingrassia, S. Rouzeau, F. Ribaucour, S. Thomas, I. Roland, F. Darro, F. Lefranc, R. Kiss, The Amaryllidaceae Isocarbostryl Narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts, *Neoplasia*. 9 (2007) 766–76.

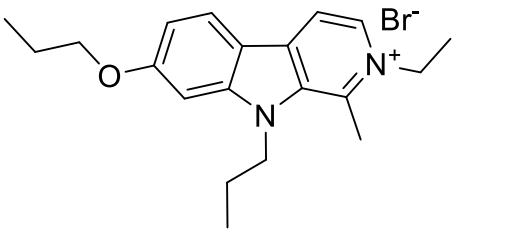
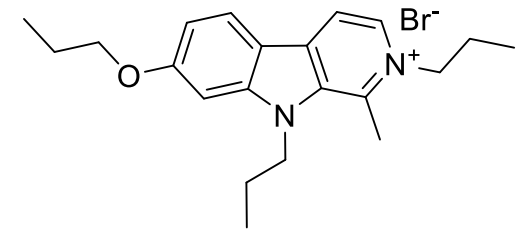
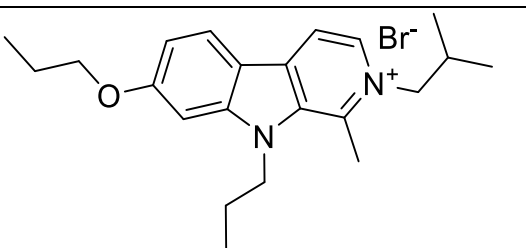
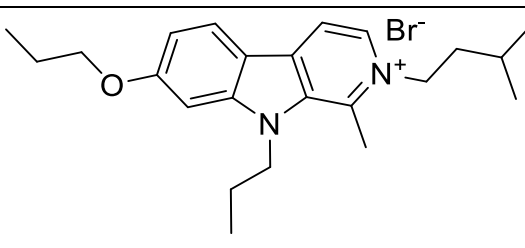
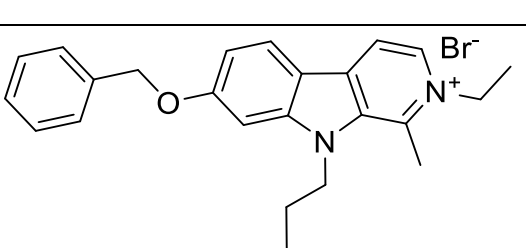
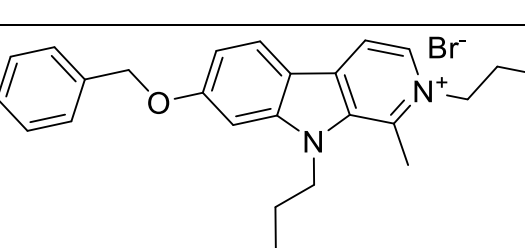
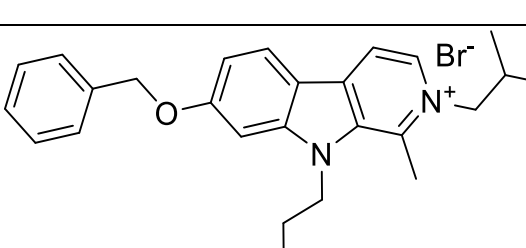
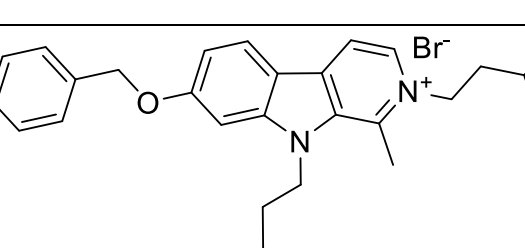
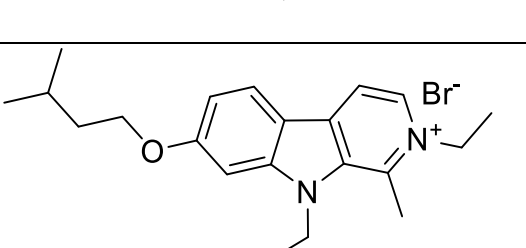
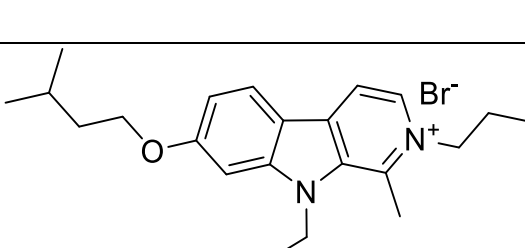
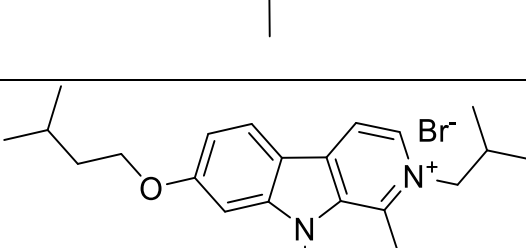
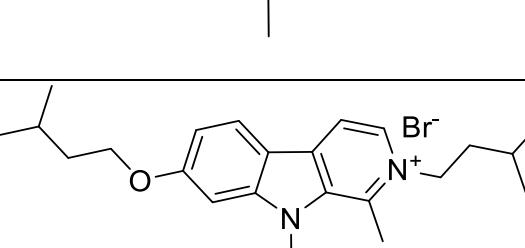
Annexe A: Structure des molécules décrites dans ce travail

Nom	Structure	Nom	Structure
2a		2b	
2c		2d	
2e		2f	
2g		2h	
2i		2j	

2k		2l	
2m		2n	
2o		2p	
2q		2r	
2s		2t	

2u		2v	
2w		2x	
2y		2z	
2aa		2ab	
2ac		3	

4a		4b	
4c		4d	
4e		4f	
4g		4h	
5a		5b	

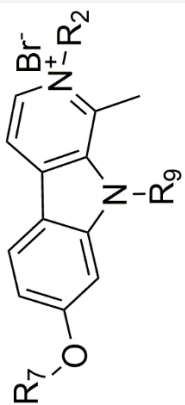
5c		5d	
5e		5f	
5g		5h	
5i		5j	
5k		5l	
5m		5n	

Annexe B: Concentration réduisant la viabilité cellulaire (IC₅₀) de 5 lignées de cellules cancéreuses humaines pour les molécules harmine et **1a-o**.

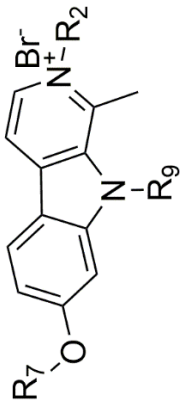
Composés	IC ₅₀ (μM)					Moyenne ±SD ^a
	Cellules d'astrogliomes		Cellules d'oligodendro- gliome	Cellules de tumeurs d'œsophage		
	U373	T98G		Hs683	OE21	
Harmine	32±2	24±2	37±1	32±2	18±1	28±7
1a	32±2	32.0±0.7	28±1	27±2	29.8±0.7	30±2
1b	24±1	22±3	23±1	12±3	25±1	21±5
1c	64±4	61±7	53±6	53±4	66±3	59±6
1d	42±2	53±3	41±3	30±4	63±4	46±13
1e	>100	86±11	>100	>100	>100	>86
1f	7.48±0.07	7.2±0.2	22±2	8.3±0.2	8.1±0.2	11±6
1g	21.3±0.8	20±2	20±1	16±3	23±3	20±3
1h	24±1	29±2	30±3	28±2	31±2	28±3
1i	2.5±0.2	3.6±0.2	8.1±0.2	5.0±0.4	6.3±0.1	5.1±2.2
1j	7.4±0.4	12±2	19±2	33±8	8.2±0.4	16±11
1k	9.3±0.2	17±3	17±2	21±1	4.1±0.6	14±7
1l	9.1±0.6	21±1	21±3	14±1	7.9±0.3	15±6
1m	18±2	36±2	33±1	28±3	40±4	31±8
1n	3.9±0.2	5.6±0.2	3.6±0.1	6.0±0.6	5.5±0.3	4.9±1.1
1o	0.44	0.48	0.49	1.3	0.7	0.7±0.4
	±0.01	±0.02	±0.05	±0.2	±0.1	

^aSD: Déviation standard

Annexe C: Structure et concentration réduisant la viabilité cellulaire (IC₅₀) de 5 lignées de cellules cancéreuses humaines pour les molécules **2a-ac**.

Cpmd	<div></div>								Activité antiproliférative: IC ₅₀ (µM) ± SD ^a				
									Cellules d'astroglomes		Cellules d'oligodendroglome	Cellules de tumeurs d'œsophage	
	R7	R9	R2	U373	T98G	OE21	OE33						
2a	3'-fluorobenzyl	3'-fluorobenzyl	-	0,40±0,06	27 ± 1	17,5 ± 0,9	7,9 ± 0,2	16 ± 2	14 ± 10				
2b	4'-fluorobenzyl	4'-fluorobenzyl	-	30 ± 1	14 ± 2	17 ± 2	15 ± 2	25 ± 2	20 ± 7				
2c	CH ₂ -cyclohexyl	CH ₂ -cyclohexyl	-	30,7 ± 0,8	32 ± 1	30 ± 2	17 ± 2	15 ± 3	25 ± 8				
2d	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	-	32,5±0,6	34,7±0,5	30±1	30,4±0,8	ND ^b	32 ± 2				
2e	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ CH ₃	-	26 ± 1	34 ± 1	13 ± 1	23 ± 1	9 ± 1	21 ± 10				
2f	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	2'-fluorobenzyl	0,5 ± 0,2	0,37 ± 0,01	0,44 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,70 ±0,08	0,48 ± 0,13				
2g	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	4'-fluorobenzyl	0,59 ±0,06	0,56 ± 0,05	1,6 ± 0,3	0,61 ± 0,04	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,8				
2h	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₅	2,0 ± 0,3	2,4 ± 0,4	2,3 ± 0,09	2,4 ± 0,3	ND	2,3 ± 0,2				
2i	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ CH ₃	2,5 ± 0,3	11 ± 1	0,6 ± 0,1	3,4 ± 0,8	ND	5 ± 4				
2j	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₅ CH ₃	0,66 ± 0,09	3,1 ± 0,5	0,6 ± 0,1	1,9 ± 0,3	ND	1,5 ± 1,2				
2k	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	0,39 ± 0,01	1,2 ± 0,2	0,37 ± 0,03	0,50 ± 0,09	ND	0,6 ± 0,4				
2l	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ OH	9 ± 2	61 ± 6	31 ± 3	25 ± 4	ND	32 ± 22				
2m	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C ₆ H ₅	CH ₂ -C(O)-C ₆ H ₅	22 ± 2	19 ± 2	26 ± 3	17 ± 3	ND	21 ± 4				

^aSD: Déviation standard ^bND: Non déterminé

Cpmd							Activité antiproliférative: IC ₅₀ (µM) ± SD ^a					
							Cellules d'astroglomes		Cellules d'oligodendroglome	Cellules de tumeurs d'œsophage		Moyenne
										OE21	OE33	
	R7	R9	R2	U373	T98G	Hs683	OE21	OE33				
2n	3'-fluorobenzyl	3'-fluorobenzyl	CH ₂ -C ₆ H ₅	0,82 ± 0,08	0,97 ± 0,02	2,8 ± 0,4	0,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1,6 ± 1,2			
2o	3'-fluorobenzyl	3'-fluorobenzyl	2'-fluorobenzyl	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,3	3,0 ± 0,2	1,6 ± 1,0			
2q	4'-fluorobenzyl	4'-fluorobenzyl	CH ₂ -C ₆ H ₅	0,43 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,9 ± 0,1	0,50 ± 0,09	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,4			
2r	4'-fluorobenzyl	4'-fluorobenzyl	2'-fluorobenzyl	0,46 ± 0,08	0,43 ± 0,02	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,6			
2s	4'-fluorobenzyl	4'-fluorobenzyl	4'-fluorobenzyl	2,9 ± 0,1	14 ± 2	13 ± 1	3,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3	4,8 ± 5,6			
2u	CH ₂ -cyclohexyl	CH ₂ -cyclohexyl	2'-fluorobenzyl	1,42 ± 0,08	0,070 ± 0,008	0,25 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,5 ± 0,5			
2v	CH ₂ -cyclohexyl	CH ₂ -cyclohexyl	4'-fluorobenzyl	0,04 ± 0,01	2,0 ± 0,6	3,1 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,6 ± 1,1			
2w	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ OH	2,5 ± 0,3	2,9 ± 0,4	4,0 ± 0,3	7,6 ± 0,3	ND ^b	4,0 ± 2,3			
2x	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	0,22 ± 0,03	0,41 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,48 ± 0,04	ND	0,34 ± 0,12			
2y	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	(CH ₂) ₂ -CH(CH ₃) ₂	CH ₂ -C ₆ H ₅	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1	ND	3,4 ± 0,2			
2z	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ CH ₃	CH ₂ -C ₆ H ₅	0,41 ± 0,03	1,7 ± 0,5	2,6 ± 0,2	0,57 ± 0,08	0,3 ± 0,02	1,1 ± 1,0			
2aa	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ CH ₃	2'-fluorobenzyl	0,39 ± 0,01	1,8 ± 0,3	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,7 ± 0,6			
2ab	CH ₂ -C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ CH ₃	4'-fluorobenzyl	0,88 ± 0,06	5,7 ± 0,2	3,1 ± 0,6	1,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,5 ± 2,0			
2ac	H	CH ₂ -C ₆ H ₅	-	80 ± 2	81 ± 11	79 ± 4	35 ± 2	35 ± 2	62 ± 25			

^aSD: Déviation standard ^bND: Non déterminé

Annexe D: Activités expérimentale et prédite par le modèle CoMFA des molécules harmine, **1a-o**, **2a-ac** et **4f-g** sur la lignée de cellules cancéreuse Hs683

Composés	pIC ₅₀ expérimental	pIC ₅₀ prédit	Résiduels ^a
harmine	4,43	4,39	0,04
1o	6,31	6,42	-0,11
2p	5,35	5,07	0,28
2t	6,42	6,30	0,12
1a	4,55	4,61	-0,06
1b	4,64	4,68	-0,04
1c	4,28	4,28	0,00
1d	4,39	4,21	0,18
1e	>4,00	4,63	-0,63
1f	4,66	4,54	0,13
1g	4,70	4,26	0,44
1h	4,52	4,58	-0,06
1i*	5,09	4,60	0,49
1j*	4,72	4,72	0,00
1k	4,77	4,67	0,10
1l*	4,68	4,15	0,53
1m	4,48	4,69	-0,21
1n*	5,44	6,39	-0,95
2a	4,76	4,65	0,11
2b	4,77	4,54	0,23
2c	4,52	4,57	-0,05
2d	4,52	4,68	-0,16
2e	4,89	4,48	0,41
2f	6,36	6,12	0,24
2g	5,80	5,19	0,61
2h*	5,64	5,15	0,49
2i*	6,22	5,95	0,27
2j	6,22	5,93	0,29
2k	6,43	6,17	0,26
2l	4,51	4,94	-0,43

Suite			
Composés	pIC ₅₀ expérimental	pIC ₅₀ prédit	Résiduels ^a
2m	4,59	4,50	0,09
2n*	5,55	5,86	-0,31
2o	5,66	5,53	0,13
2q*	6,05	6,33	-0,28
2r	5,92	6,07	-0,15
2s	4,89	5,10	-0,21
2u	6,60	6,33	0,27
2v	5,51	6,22	-0,71
2w	5,40	4,97	0,43
2x	6,59	6,10	0,49
2y	5,51	5,68	-0,17
2z	5,59	6,37	-0,78
2aa	6,35	6,37	-0,02
2ab*	5,51	5,44	0,08
2ac	4,10	4,16	-0,06
4f	4,00	4,66	0,66
4g	4,00	4,02	0,02
4h	4,00	3,96	-0,04

*Molécule faisant partie du *test set* ^aLes résiduels représentent la différence entre la valeur de pIC₅₀ prédite et la valeur de pIC₅₀ expérimentale, pour chaque molécule

Annexe E: Liste des publications

C. Meinguet, B. Masereel, J. Wouters, Preparation and characterization of a new harmine-based antiproliferative compound in complex with cyclodextrin: Increasing solubility while maintaining biological activity, *Eur. J. Pharm. Sci.* 77 (2015) 135–140. doi:10.1016/j.ejps.2015.06.010.

A. Carletta, **C. Meinguet**, J. Wouters, A. Tilborg, Solid-State Investigation of Polymorphism and Tautomerism of Phenylthiazole-thione: A Combined Crystallographic, Calorimetric, and Theoretical Survey, *Cryst. Growth Des.* (2015). doi:10.1021/acs.cgd.5b00237.

C. Meinguet, C. Bruyère, R. Frédérick, V. Mathieu, C. Vancraeynest, L. Pochet, J. Laloy, J. Mortier, G. Wolber, R. Kiss, B. Masereel, J. Wouters, 3D-QSAR, Design, Synthesis and characterization of trisubstituted harmine derivatives with in vitro antiproliferative properties, *Eur. J. Med. Chem.* 94 (2015). doi:10.1016/j.ejmech.2015.02.044.

E. Dolušić, P. Larrieu, **C. Meinguet**, D. Colette, A. Rives, S. Blanc, T. Ferain, L. Pilotte, V. Stroobant, J. Wouters, B. Van den Eynde, B. Masereel, E. Delfourne, R. Frédérick, Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory activity of derivatives of marine alkaloid tsitsikammamine A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 47–54. doi:10.1016/j.bmcl.2012.11.036.

R. Frédérick, C. Bruyère, C. Vancraeynest, J. Reniers, **C. Meinguet**, L. Pochet, A. Backlund, B. Masereel, R. Kiss, J. Wouters, Novel trisubstituted harmine derivatives with original in vitro anticancer activity, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 6489–501. doi:10.1021/jm300542e.

D. Cobessi, R. Dumas, V. Pautre, **C. Meinguet**, J.-L. Ferrer, C. Alban, Biochemical and Structural Characterization of the Arabidopsis Bifunctional Enzyme Dethiobiotin Synthetase – Diaminopelargonic Acid Aminotransferase : Evidence for Substrate Channeling in Biotin Synthesis, *Plant Cell.* 24 (2012) 1608–1625. doi:10.1105/tpc.112.097675.

J. Reniers, **C. Meinguet**, L. Moineaux, B. Masereel, S.P. Vincent, R. Frederick, J. Wouters, Synthesis and inhibition study of monoamine oxidase, indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase by 3,8-substituted 5H-indeno[1,2-c]pyridazin-5-one derivatives., *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 6104–11. doi:10.1016/j.ejmech.2011.09.042.

